



**Ana Rita Castro  
Carvalho**

## **Mecanismos de resposta a mercúrio em plantas de sapal**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Métodos Biomoleculares Avançados, realizada sob a orientação científica da Professora Doutora Etelvina Figueira, Professora Auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro e da Professora Doutora Eduarda Pereira, Professora Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro.

## **o júri**

presidente

**Prof. Dr. Artur Manuel Soares da Silva**  
Professor Catedrático, Universidade de Aveiro

**Prof. Dr. Miguel Ângelo do Carmo Pardal**  
Professor Associado com Agregação, Universidade de Coimbra

**Prof. Dra. Etelvina Maria de Almeida Paula Figueira**  
Professora Auxiliar, Universidade de Aveiro

**Prof. Dra. Maria Eduarda da Cunha Pereira**  
Professora Auxiliar, Universidade de Aveiro

## **agradecimentos**

Gostaria de agradecer a todos os que directa ou indirectamente contribuíram e me incentivaram durante a realização desta tese. Quero, no entanto, salientar a minha profunda gratidão:

À Doutora Etelvina Maria de Almeida Paula Figueira, Professora Auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro, orientadora desta tese, pela ajuda prestada e pelo apoio que sempre me concedeu.

À Doutora Maria Eduarda da Cunha Pereira, Professora Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro, co-orientadora desta tese, pela disponibilidade e apoio que me concedeu.

À Ana e à Sofia pela grande amizade e incentivo sempre demonstrados, pelas preciosas discussões científicas que tanto contribuíram para o sucesso deste trabalho, mas principalmente porque fizeram com que eu nunca deixasse de acreditar em mim.

À Sofia Cortiçeiro, pela compreensão, camaradagem e também pelo bom ambiente de trabalho proporcionado.

À FCT, pelo financiamento do trabalho prático desta tese através do projecto POCI/AMB/59311/2004 – Fitorremediação de áreas de sapal contaminadas por mercúrio.

Ao Centro de Biologia Celular e ao grupo de Química Ambiental: Águas, Solos e Sistemas Aquáticos da Universidade de Aveiro pela disponibilização dos equipamentos necessários à realização do trabalho.

Ao grupo de Química Ambiental: Águas, Solos e Sistemas Aquáticos da Universidade de Aveiro, pelo bom ambiente de trabalho proporcionado e pela simpatia com que sempre me receberam.

À Mónica Válega pela ajuda nas saídas de campo e pelo auxílio prestado na quantificação de mercúrio nos sedimentos e plantas.

Ao Sr. Abílio, pois sem ele não teria sido possível executar as saídas de campo.

À minha mãe, avó e tio por todo o amor, carinho, paciência e apoio incondicionais que sempre me proporcionaram, mesmo nos momentos mais difíceis e pelos conselhos que me deram nos maiores momentos de indecisão e quebra.

A todos os meus amigos, sem esquecer nenhum, mas em particular à Andreia, pelo coragem que sempre me incutiram e pelo apoio incondicionalmente prestados.

Finalmente, mas não menos importante, ao Leonel pelo amor, carinho e compreensão que demonstrou, estando sempre ao meu lado nos melhores e piores momentos que ocorreram durante esta longa caminhada.

## palavras chave

Fitoquelatinas; fitorremediação; mercúrio; sapal; stresse oxidativo

## resumo

Os sapais encontram-se entre os ecossistemas mais produtivos do mundo, suportando um número elevado de espécies vegetais e animais. O mercúrio é considerado um dos metais mais tóxicos, em que os seus efeitos adversos têm repercussões ao longo da cadeia alimentar de todo o ecossistema.

A recuperação do mercúrio de lamas e esgotos industriais é obrigatória por lei, contudo, a descontaminação de zonas estuarinas e cursos de água que já se encontram poluídos tem sido negligenciada, dado que as técnicas correntes de remediação de mercúrio utilizam processos físico-químicos, dispendiosos, perturbadores do ambiente e frequentemente ineficazes. Um sistema de fitorremediação, em que as plantas extraem, sequestram ou desintoxicam o mercúrio dos sedimentos de sistemas aquáticos poderá ser uma solução mais atraente. No entanto, esta técnica encontra-se ainda numa fase inicial de desenvolvimento, sendo necessária uma maior investigação sobre os mecanismos moleculares subjacentes à acumulação de metais de modo a otimizar os processos inerentes a esta técnica de remediação.

Neste contexto, o presente trabalho incidiu sobre o estudo do papel que as espécies vegetais *A. patula*, *H. portulacoides*, *J. maritimus* e *P. australis* possuem na descontaminação de uma área específica do sapal da Ria de Aveiro, o Esteiro de Estarreja, sujeito a uma elevada contaminação por mercúrio. Os principais objectivos deste trabalho incluíram, numa primeira fase, a análise dos níveis de contaminação dos rizosedimentos das várias espécies de plantas bem como da sua caracterização físico-química, o que permitiu avaliar os níveis de toxicidade experimentados pelas espécies. A análise da acumulação e distribuição de Hg nos diferentes órgãos das várias espécies vegetais, bem como a quantificação da biomassa aérea permitiram determinar o potencial de fitorremediação de cada uma das espécies da comunidade do Esteiro de Estarreja.

O trabalho apresentado engloba também a análise de mecanismos moleculares responsáveis pela tolerância a Hg nestas espécies, com particular incidência nos seus efeitos a nível oxidativo através da quantificação de espécies reactivas de oxigénio e de danos oxidativos e na subsequente resposta antioxidante através da quantificação de defesas antioxidantes enzimáticas. A quantificação dos níveis de tióis (glutathiona e fitoquelatinas), conhecidos mecanismos na sequestração intracelular de metais em plantas, foi igualmente determinada, tendo sido avaliado o seu contributo na tolerância a Hg nestas espécies.

Os resultados obtidos demonstraram que as diferentes espécies apresentaram diferenças importantes na acumulação e distribuição de Hg. As espécies dicotiledóneas *A. patula* e *H. portulacoides* apresentaram níveis semelhantes de Hg nos seus órgãos e as espécies monocotiledóneas *J. maritimus* e *P. australis* acumularam mais metal nos seus órgãos subterrâneos.

Foi igualmente determinada a distribuição de Hg nas diferentes fracções celulares, uma vez que a partição metálica é fundamental para inferir o grau de toxicidade que as plantas experienciam e a mobilidade de Hg no sapal.

Embora se tenham verificado diferenças importantes na acumulação e distribuição de Hg entre as várias espécies estudadas, a estratégia geral que adoptaram para lidar com exposições ambientais de Hg foi a imobilização do metal na fracção insolúvel, o que sugere que esta estratégia é o principal mecanismo de tolerância a Hg nestas espécies.

A acumulação e distribuição de Hg, em conjunto com o trabalho subsequente, determinaram a capacidade de fitorremediação das espécies estudadas. Assim, *J. maritimus* e *P. australis* apresentaram-se como as melhores candidatas para processos de fitoestabilização e todas as espécies, com excepção de *A. patula*, apresentam capacidades semelhantes de fitoextracção.

A avaliação de parâmetros relacionados com o stresse oxidativo permitiu inferir os níveis de stresse em que cada planta se encontrava. Observou-se que todas as espécies apresentaram sintomas de stresse oxidativo associados à acumulação de Hg. Contudo, *A. patula* foi a espécie que apresentou níveis mais elevados de stresse oxidativo, ao contrário de *J. maritimus* e *P. australis* que se apresentaram com menos danos oxidativos. Estas diferenças entre as espécies deveram-se, possivelmente, à acção das enzimas antioxidantes. As dicotiledóneas apresentaram níveis mais baixos de todas as enzimas nas folhas, enquanto que as monocotiledóneas apresentaram níveis mais elevados de SOD e GPx, particularmente nos órgãos subterrâneos.

A determinação de tióis (glutathiona e fitoquelatinas) permitiu estimar a sua importância na tolerância ao mercúrio. Os resultados obtidos trouxeram novos dados sobre o papel das fitoquelatinas em exposições ambientais a Hg. Observou-se que em todas as espécies houve síntese de fitoquelatinas, tendo-se observado diferenças entre elas. Nas dicotiledóneas e nos órgãos aéreos das monocotiledóneas a síntese de PCs foi, de facto, a principal resposta à presença de Hg. Contudo, e contrariamente ao que se observa na maioria dos trabalhos de laboratório, nas espécies monocotiledóneas, o órgão com maior acumulação de mercúrio foi aquele que apresentou menor conteúdo em fitoquelatinas, sugerindo que a síntese destes agentes quelantes não parece ser o principal mecanismo de tolerância a mercúrio, podendo entrar em acção outros mecanismos de tolerância complementares.

Os resultados obtidos neste trabalho permitiram uma melhor compreensão sobre as estratégias que estas plantas de sapal utilizaram para lidar com uma elevada e crónica contaminação ambiental por Hg, mas também criaram novas perspectivas sobre os seus mecanismos e respostas moleculares à presença deste metal no ambiente. Assim, este trabalho poderá ser o ponto de partida para o desenvolvimento de competências com capacidade de intervenção na fitorremediação de áreas de sapal contaminadas, bem como para estudos de gestão ambiental e do impacto da contaminação por metais em ecossistemas estuarinos.

## keywords

Phytochelatins; phytoremediation; mercury; oxidative stress; salt marsh

## abstract

Salt marshes rank among the most productive ecosystems on earth. Among heavy metals, mercury is considered one of the most toxic metals and its effects have repercussions throughout the food chain of the entire ecosystem. The recovery of mercury from industrial sludge and liquid wastes is now required by governments, but the cleanup of previously polluted estuarine areas and waterways has been neglected. This is due partly to the fact that the physical and chemical remediation techniques currently used to extract or immobilize mercury are extremely expensive, environmentally disruptive and sometimes ineffective. A phytoremediation system, in which plants extract, sequester and/or detoxify mercury pollutants, may be a more attractive solution. However, this technique is still in a developmental stage and requires further research on the molecular mechanisms underlying the accumulation of metals in order to optimize the processes inherent to this remediation technique.

Under this context, the present work focused on the study of the role that the salt marsh species *A. patula*, *H. portulacoides*, *J. maritimus* and *P. australis* have on the decontamination of a specific salt marsh area of the Ria de Aveiro, the Estarreja Channel, subject to a high mercury contamination. Thus, the main objectives of this work included, first, the analysis of the contamination levels in the species rhizosediments and their physic-chemical characterization, which allowed inferring the toxicity levels experienced by organisms colonizing these sediments and their role in metal availability. The accumulation and distribution of Hg in the several plants as well as the aerial biomass quantification determined the phytoremediation potential of each species colonizing the Estarreja channel. The work presented also includes the analysis of molecular mechanisms responsible for plant Hg tolerance, with particular focus on the oxidative stress effects, through the quantification of reactive oxygen species and oxidative damage and on the subsequent antioxidant response through the quantification of enzymatic antioxidant defences. The levels of thiols (glutathione and phytochelatins), known mechanisms in intracellular sequestration of metals in plants, was also determined and its contribution to the Hg tolerance in these species was assessed.

The results showed that the several species presented significant differences in Hg accumulation and distribution. The dicotyledons *A. patula* and *H. portulacoides* revealed similar Hg levels in all their organs and monocotyledonous *J. maritimus* and *P. australis* accumulated more metal in their belowground organs. It was also determined the distribution of Hg in different cell fractions, since the metal partition is essential to infer the degree of toxicity that plants experience and to assess the Hg mobility in the salt marsh system. Although there were important differences in the accumulation and distribution of Hg between the studied species, the overall strategy they have adopted to deal with Hg environmental exposure was the metal immobilization in cell walls, suggesting that this strategy is the main Hg tolerance mechanism in these species.

The Hg accumulation and distribution, together with the subsequent work, determined the phytoremediation capacity of these species. Thus, *J. maritimus* and *P. australis* presented itself as the best candidates for Hg phytostabilization and with *A. patula* exception, all species presented similar phytoextraction capabilities.

The evaluation of parameters related to oxidative stress allowed to infer the levels of stress that each plant experienced. It was observed that all species showed oxidative stress symptoms associated with Hg accumulation. However, *A. patula* was the species with higher oxidative stress levels, unlike *J. maritimus* and *P. australis* that had less oxidative damage. These differences between species are due to the action of antioxidant enzymes. The dicotyledons showed lower levels of enzyme activities in the leaves, while the monocots had higher levels of SOD and GPx, particularly in the belowground organs.

The thiol quantification (glutathione and phytochelatins) allowed to estimate its importance in the plants Hg tolerance. The results have brought new data on the role of phytochelatin in Hg environmental exposures. It was noticed that PC synthesis occurred in all species, however important differences were observed between them. In dicotyledons and in aerial organs of monocots the synthesis of PCs was, in fact, the main response to the Hg accumulation. However, in opposition to most laboratory works, in the monocots, the organs with higher Hg accumulation were the ones that showed a lower phytochelatin content, suggesting that the synthesis of these chelating agents is not the main mechanism behind Hg tolerance, and that other complementary tolerance mechanisms may come to action.

The results obtained in this work provided a better understanding of the strategies used by salt marsh plants to cope with a strong and chronic environmental Hg contamination, but also created new perspectives on their molecular mechanisms and responses to the presence of metal in the environment. Thus, this work may be the starting point for the development of skills with intervention capacity in the phytoremediation of salt marsh contaminated areas as well as for environmental management studies and impact of metal disposal in estuarine ecosystems.

## ÍNDICE GERAL

Agradecimentos-----	iii
Palavras-chave -----	iv
Resumo-----	iv
Key words -----	vi
Abstract -----	vi
Índice geral -----	viii
Símbolos e abreviaturas -----	xii

### CAPÍTULO I: Introdução

1.1 Sapal e contaminação por mercúrio -----	14
1.2 Resposta das plantas a mercúrio -----	16
1.2.1 Mecanismos de restrição metálica -----	17
1.2.2 Mecanismos intracelulares de tolerância -----	18
1.2.2.1 Indução do sistema antioxidante -----	18
1.2.2.2 Indução de compostos quelantes do metal -----	19
1.3 Fitorremediação – Uma nova abordagem para a remediação de locais contaminados	19
1.3.1 Tipos de Fitorremediação -----	20
1.3.2 Fitorremediação de mercúrio em zonas de sapal -----	21
1.4 Objectivos gerais do trabalho -----	22

### CAPÍTULO II: Acumulação e distribuição de mercúrio em plantas de sapal

<b>1. Introdução -----</b>	<b>24</b>
1.1 Acumulação e disponibilidade de mercúrio nos sedimentos -----	24
1.2 Absorção, translocação e acumulação de mercúrio nos tecidos vegetais-----	26
1.3 Objectivos -----	29
<b>2. Material e métodos-----</b>	<b>30</b>
2.1 Caracterização do local de amostragem -----	30



2.2 Espécies vegetais usadas -----	31
2.3 Colheita de sedimentos e plantas -----	34
2.4 Determinação dos parâmetros físico-químicos dos sedimentos -----	34
2.4.1 Determinação do teor em água -----	34
2.4.2 Determinação do teor em matéria orgânica -----	34
2.4.3 Determinação do pH e do potencial redox (Eh) -----	35
2.5 Determinação da biomassa aérea vegetal -----	35
2.6 Determinação da concentração de mercúrio total -----	35
2.6.1 Concentração de mercúrio total nos sedimentos -----	35
2.6.2 Concentração de mercúrio total nas plantas -----	36
2.6.3 Concentração de mercúrio nas fracções solúvel e insolúvel nas plantas -----	36
2.7 Tratamento estatístico -----	37
 <b>3. Resultados -----</b>	<b>38</b>
3.1 Parâmetros físico-químicos dos sedimentos -----	38
3.2 Hg nos sedimentos -----	39
3.3 Hg nas plantas -----	40
3.3.1 Acumulação de Hg total -----	40
3.3.2 Absorção, acumulação e translocação de Hg -----	41
3.3.3 Acumulação de Hg nas fracções solúvel e insolúvel -----	43
3.3.4 Partição do Hg nas fracções intracelulares -----	44
3.3.5 “Pools” de Hg na parte aérea -----	45
 <b>4. Discussão -----</b>	<b>47</b>
4.1 Mercúrio nos sedimentos e a sua biodisponibilidade -----	47
4.2 Absorção, acumulação e translocação do mercúrio nas plantas -----	49
4.3 Fraccionamento celular do mercúrio -----	52
4.4 Potencial para fitorremediação de mercúrio e o seu significado ecológico -----	54

**CAPÍTULO III: O stresse oxidativo como resposta ao stresse metálico**

<b>1. Introdução</b>	56
1.1 Espécies reactivas de oxigénio e danos oxidativos	56
1.2 O Sistema de defesa antioxidante	58
1.2.1 Mecanismos não enzimáticos de desintoxicação de ROS	58
1.2.2 Mecanismo enzimáticos de desintoxicação de ROS	59
1.3 Objectivos	61
<b>2. Material e métodos</b>	63
2.1 Determinação de ROS	63
2.1.1 Conteúdo em radical superóxido ( $O_2^-$ )	63
2.2 Determinação de danos celulares	63
2.2.1 Peroxidação Lipídica	63
2.2.2 Carbonilação Proteica	64
2.3 Determinação da actividade de enzimas antioxidantes	65
2.3.1 Superóxido Dismutase	65
2.3.2 Catalase	65
2.3.3 Glutathiona Peroxidase	66
2.4 Quantificação da proteína	67
2.5 Tratamento estatístico	67
<b>3. Resultados</b>	68
3.1 Espécies reactivas de oxigénio	68
3.2 Danos celulares	69
3.3 Enzimas antioxidantes	71
<b>4. Discussão</b>	74
4.1 ROS e Danos oxidativos	74
4.2 Enzimas antioxidantes	77
4.3 Conclusões gerais	80

**CAPÍTULO IV: Agente de complexação metálica: fitoquelatinas**

<b>1. Introdução</b>	82
1.1 Estrutura e biossíntese das fitoquelatinas	82
1.2 A complexação de metais e sequestração no vacúolo	84
1.3 A importância das fitoquelatinas na tolerância a metais	86
1.4 Objectivos	88
<b>2. Material e métodos</b>	89
2.1 Extracção e separação dos tióis por HPLC	89
2.1.1 Homogeneização do material vegetal	89
2.1.2 Redução e derivatização dos tióis	89
2.1.3 Separação e identificação dos tióis por HPLC	90
2.2 Tratamento estatístico	90
<b>3. Resultados</b>	91
3.1 Síntese de fitoquelatinas	91
3.2 Relação entre os níveis de GSH e de PCs	93
<b>4. Discussão</b>	94
4.1 A indução de fitoquelatinas em plantas sujeitas a contaminação ambiental por mercúrio	94
4.2 A relação entre a síntese de PCs e os padrões de acumulação de Hg nas diferentes espécies	95
4.3 Conclusões gerais	99
<b>Capítulo V: Conclusões finais e Perspectivas para trabalho futuro</b>	102
<b>Bibliografia</b>	104

## Símbolos e abreviaturas

<b>Ala</b>	alanina
<b>AS</b>	ascorbato
<b>ATP</b>	trifosfato de adenosina
<b>APX</b>	ascorbato peroxidase
<b>BSO</b>	butionina sulfoxamina
<b>C</b>	caule
<b>CAT</b>	catalase
<b>CEC</b>	capacidade de troca catiónica
<b>Cis</b>	cisteína
<b>DHA</b>	dihidroascorbato
<b>DHAR</b>	dihidroascorbato redutase
<b>DNA</b>	ácido desoxirribonucleico
<b>DNPH</b>	dinitrofenilhidrazina
<b>DTE</b>	ditioeritritol
<b>DTT</b>	ditiotreitol
<b>Eh</b>	potencial redox
<b>EDTA</b>	ácido etilenodiamino tetracético
<b>F</b>	folha
<b>Gli</b>	glicina
<b>Glu</b>	glutamato
<b>GPx</b>	glutathione peroxidase
<b>GR</b>	glutathione reductase
<b>GSH</b>	glutathione reduzida
<b>GSSG</b>	glutathione oxidada
<b>ha</b>	hectar
<b>HCl</b>	ácido clorídrico
<b>HEPES</b>	ácido N-2-hidroxmetilpiperazino-N'-2-etanosulfónico
<b>HMW</b>	maior peso molecular
<b>HPLC</b>	cromatografia líquida de alta pressão

<b>KOH</b>	hidróxido de potássio
<b>LMW</b>	baixo peso molecular
<b>M</b>	molar
<b>mBBr</b>	monobromobimano
<b>MDA</b>	malondialdeído
<b>MDAR</b>	monodihidroascorbato redutase
<b>MDHA</b>	monodihidroascorbato
<b>NADPH</b>	nicotinamida adenina dinucleotido fosfato
<b>O<sub>2</sub><sup>•-</sup></b>	radical superóxido
<b>OH<sup>•</sup></b>	radical hidroxilo
<b>PA</b>	parte aérea
<b>PCs</b>	fitoquelatinas
<b>PCS</b>	fitoquelatina sintetase
<b>PF</b>	peso fresco
<b>PMSF</b>	fenilmetanosulfunil
<b>PS</b>	parte subterrânea
<b>Purpald</b>	4-amino-3-hidrazino-5-mercapto-1,2,4-triazole
<b>PVP</b>	polivinilpirrolidona
<b>R</b>	raiz
<b>ROS</b>	espécies reactivas de oxigénio
<b>Rz</b>	rizoma
<b>Sed</b>	sedimento
<b>Ser</b>	serina
<b>SH</b>	sulfidril
<b>SOD</b>	superóxido dismutase
<b>TBA</b>	ácido tiobarbitúrico
<b>TCA</b>	ácido tricloroacético
<b>TFA</b>	ácido trifluoracético
<b>Tris</b>	2-amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanodiol
<b>γ-Glu-Cis</b>	γ-glutamilcisteína

# Capítulo I

---

## Introdução

---

### 1.1 Sapal e contaminação por mercúrio

Os sistemas estuarinos são zonas de transição entre os rios e o mar. Estes ecossistemas providenciam condições únicas para o desenvolvimento de vários organismos a nível de habitat, alimentação e reprodução (Adam, 1990; Williams et al., 1994a). Um dos mais importantes ecossistemas que integra os sistemas estuarinos é o sapal. Os sapais são regiões dinâmicas localizadas em ambientes costeiros com elevada importância económica e ambiental. Além de representarem importantes fontes de nutrientes das quais dependem as actividades de pesca costeira, desempenham igualmente um papel preponderante na preservação da costa, auxílio no controlo da inundação, actuando contra os efeitos nefastos da erosão (Allen e Pie, 1992; Williams et al., 1994a). Em Portugal a maioria dos sapais está sujeita    acção regular das marés que os inundam periodicamente, o que promove a cria  o de ambientes instáveis, com elevadas varia  es de salinidade e temperatura semi-diurnas e sazonais (Caçador et al., 2000).

As condi  es físico-químicas dos sapais são adversas relativamente    nutri  o, crescimento e reprodu  o da maioria das plantas vasculares, limitando assim o número das espécies capazes de suportar estas condi  es ambientais. Com efeito, os sapais são colonizados por um reduzido número de espécies, pertencentes a poucos g  neros, cosmopolitas, com características fisiológicas, morfológicas e ecológicas bem adaptadas ao habitat peculiar em que se desenvolvem (Adam, 1990). A maioria das plantas são classificadas como halófitas obrigatórias e halófitas facultativas, variando na sua capacidade para tolerar as elevadas concentra  es salinas dos sedimentos (Alongi, 1997). A frequência e dura  o do período de submersão, bem como a salinidade são factores

determinantes na composição florística das comunidades que vivem nas zonas entre-marés. Estas espécies possuem características que lhes permitem sobreviver nestas condições adversas, nomeadamente redução da área foliar, aumento da suculência das folhas e caules, bem como da massa radicular, protecção dos órgãos aéreos por uma cutícula espessa, presença de glândulas secretoras de sais e acumuladoras de iões nas folhas e presença de aerênquimas (Rozema et al., 1985).

Tipicamente, nos sapais distinguem-se três zonas distintas que são colonizadas por plantas vasculares: 1) zona pioneira ou baixo sapal – onde se encontram espécies como *Spartina maritima* e *Salicornia nitens*. 2) sapal intermédio - esta zona é normalmente colonizada por *Halimione portulacoides*, *Arthrocnemum fruticosum*, *Arthrocnemum perenne*, *Aster tripolium*, *Puccinella maritima* e *Triglochin maritima* e 3) zona alta do sapal - onde se encontram habitualmente *Atriplex halimus*, *Arthrocnemum glaucum*, *Inula chritmoides*, *Suaeda vera*, *Juncus spp.* e *Festuca rubra* (Adam, 1990; Cooper, 1982).

Os sapais funcionam frequentemente como receptores directos dos desperdícios industriais e municipais e também de compostos agrícolas, originando um aumento das concentrações de metais nos sedimentos. Deste modo, os seus sedimentos são considerados um reservatório de metais introduzidos antropogenicamente no ambiente (Beefink et al., 1982; Chenhall et al., 1992; Doyle e Otte, 1997; Goldberg et al., 1977; Guerzoni et al., 1984; Hart, 1992; Kuhlmeier et al., 1991; Lindau et al., 1982; McCaffrey et al., 1980; Williams et al., 1994a). Ao actuar como um reservatório de metais pesados, estes sistemas reduzem a contaminação de ecossistemas circundantes (Jacob e Otte, 2003). No entanto, o aumento dos níveis de poluentes pode alterar a sua capacidade de incorporar desperdícios, transformando estes ambientes numa fonte de toxicidade.

Entre os metais pesados, o mercúrio (Hg) é considerado um dos metais pesados mais tóxicos, uma vez que todas as suas formas químicas apresentam um elevado grau de toxicidade para o biota. Este metal pode encontrar-se em três formas distintas, que variam na sua solubilidade e reactividade (Clarkson, 2002) sendo, no entanto, todas elas tóxicas. Nos ecossistemas aquáticos este metal pode ocorrer na forma elementar ( $\text{Hg}^0$ ), de iões  $\text{Hg}^{2+}$  e  $\text{Hg}^+$ , ou ainda como metilmercúrio (MeHg) (Mason e Fitzgerald, 1993).

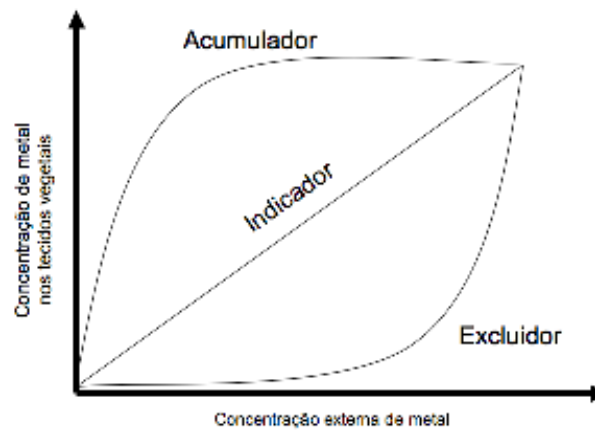
Uma vez introduzido nos ambientes de sapal, o mercúrio é alvo de vários tipos de transformações que estão na base das diferentes formas anteriormente descritas, levando a diferentes graus de contaminação. Um dos problemas associados à presença de mercúrio

em sedimentos de sapal, é o facto das suas espécies inorgânicas não reactivas poderem ser metiladas através de processos bacterianos, levando à formação de espécies organomercúricas, mais tóxicas e que podem ser mobilizadas e entrarem em processos de bioacumulação (Richardson, 1997; Williams et al., 1994a). Nos sapais, a disponibilidade do mercúrio para as plantas está dependente de diversos factores, nomeadamente de características físico-químicas dos sedimentos e também de características inerentes às próprias plantas (Crowder 1991; Marins et al., 1997; Williams et al., 1994a).

## **1.2 Resposta das plantas a mercúrio**

Vários trabalhos demonstraram que as plantas de sapal têm a capacidade de acumular mercúrio (Burke et al., 2000; Capiomont et al., 2000; Newell et al., 1982; Rahn 1973; Válega et al., 2008; Windham et al., 2003). Embora se verifique na literatura uma escassez de informação sobre mecanismos de tolerância a este metal em plantas, os mecanismos globais de tolerância a metais permitem classificar as plantas em diferentes tipos. Segundo Baker (1981) as plantas desenvolveram três estratégias básicas para crescer em locais contaminados: (1) Plantas excludoras de metal - estas plantas impedem eficazmente a acumulação de metais, especialmente nas suas partes aéreas, sob uma larga escala de concentrações de metal no solo; (2) Plantas indicadoras de metal - estas plantas acumulam metais nos seus tecidos como reflexo dos níveis de metal existentes no solo; (3) Plantas acumuladoras de metal - estas espécies de plantas (hiperacumuladoras) podem concentrar metais nos seus tecidos em níveis muito superiores aos que existem no solo (Figura I-1).





**Figura I-1:** Tipos de absorção metálica nas plantas e a sua relação com a concentração externa de metal (adaptado de Prasad e Hagemeyer, 1999).

Os trabalhos efectuados nas últimas décadas têm vindo a demonstrar que esta capacidade de tolerância à presença de metais, sem aparente toxicidade, é fruto de complexos mecanismos que as plantas desenvolveram e que lhes tem garantido a sobrevivência em locais mais adversos (Lasat, 2002). Existem diversos mecanismos que podem contribuir para a tolerância dos metais nas plantas, dependendo do tipo de metal e das espécies vegetais. Estes mecanismos de defesa podem dividir-se em 2 tipos: mecanismos de restrição metálica e mecanismos intracelulares de tolerância.

### 1.2.1 Mecanismos de restrição metálica

A restrição de metais é o mecanismo mais comum de adaptação das plantas à sua toxicidade e assenta em diferentes graus de redução da absorção do metal: 1) por secreção de agentes quelantes ou 2) ao nível da membrana plasmática, por deposição do metal nos componentes da parede celular (Meharg, 1994). A distribuição subcelular dos metais pesados num dado órgão é um factor importante na avaliação da toxicidade na planta. Assim, uma acumulação elevada de metais nas paredes celulares funciona como uma barreira de protecção, reduzindo a sua concentração no citoplasma (Zornoza et al., 2002). Alguns autores verificaram que os metais podem ser retidos por carboidratos extracelulares (Wagner, 1993) ou por grupos pécticos da parede celular (Leita et al., 1996), formando complexos muito estáveis.

A retenção do metal nas raízes é uma estratégia sobejamente conhecida que as plantas possuem, conferindo protecção aos órgãos fotossintéticos contra os efeitos nocivos dos metais (Lozano-Rodríguez et al., 1995).

No entanto, a maioria dos estudos demonstra que as plantas quando expostas a mercúrio tendem a comportar-se como excludoras, acumulando nos seus órgãos concentrações de metal inferiores às encontradas nos sedimentos (Glimour e Miller, 1973; Godbold e Hüttermann, 1988; Lindberg et al., 1979; Lodenius, 1995; Windham et al., 2003).

## **1.2.2 Mecanismos intracelulares de tolerância**

### **1.2.2.1 Indução do sistema antioxidante**

Os metais, quando presentes nas células, podem induzir stresse oxidativo através de um aumento na produção de espécies reactivas de oxigénio (ROS). Uma vez formados, os ROS necessitam de ser eliminados de modo a minimizar eventuais danos celulares (Moller, 2001). A principal linha de defesa contra o stresse oxidativo induzido por metais é o sistema antioxidante. Assim, a nível celular existem respostas antioxidantes não enzimáticas constituídas por ascorbato, glutathione (GSH), flavonóides, carotenóides, entre outras. A oxidação de GSH por ROS produz glutathione oxidada (GSSG) e a oxidação do ascorbato produz monodihidroascorbato (MDHA) e dihidroascorbato (DHA).

Além das respostas antioxidantes não enzimáticas, existem igualmente respostas enzimáticas que incluem enzimas tais como a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT), a glutathione peroxidase (GPx), a ascorbato peroxidase (APX) e a glutathione redutase (GR) entre outras. Assim, compostos e enzimas antioxidantes actuam no sentido de interromper cascatas de oxidação descontroladas (Noctor e Foyer, 1998).

### **1.2.2.2 Indução de compostos quelantes do metal**

A sequestração intracelular de metais é um mecanismo eficaz de minimizar os seus efeitos tóxicos nas plantas. Existem vários agentes quelantes de metais, nomeadamente ácidos orgânicos, metalotioninas, fitinas e aminoácidos (Rauser, 1999). Apesar destes compostos serem associados a outros metais, existe pouca informação sobre a acção destes mecanismos na resposta a mercúrio. No entanto, alguns trabalhos mostraram que o mercúrio pode induzir a produção de péptidos específicos, denominados fitoquelatinas (Gupta et al., 1998; Maitani et al., 1996).

As fitoquelatinas (PCs) formam uma família de péptidos que consiste em repetições do dipéptido  $\gamma$ -Glu-Cis seguidos por uma glicina terminal, em que a estrutura básica é  $(\gamma\text{-Glu-Cis})_n\text{Gli} \text{ [(PC)}_n\text{]}$ , onde “n” varia geralmente entre dois e onze. Estes péptidos são sintetizados enzimaticamente a partir da glutatona (GSH) em resposta a vários metais (Rauser, 1990) e constituem o mecanismo de tolerância a metais mais conhecido nas plantas. As fitoquelatinas são rapidamente induzidas, sequestrando e inactivando os iões metálicos que entram no citosol antes que estas possam inactivar enzimas de vias metabólicas essenciais.

## **1.3 Fitorremediação – Uma nova abordagem para remediação de locais contaminados**

A presença dos mecanismos anteriormente descritos permite às plantas tolerar e acumular concentrações elevadas de metais. Estas características permitem a introdução de uma nova abordagem de descontaminação de solos – a fitorremediação.

Os métodos comuns usados para eliminar os agentes contaminantes de ambientes poluídos são tratamentos químicos com agentes quelantes, enterro profundo ou remoção do local. Estas metodologias são pouco práticas uma vez que são extremamente dispendiosas, ambientalmente perturbadoras e por vezes ineficazes. Um sistema de fitorremediação, em que as plantas absorvem, extraem e/ou sequestram o mercúrio diminuindo a contaminação de um local (Raskin, 1996), é uma solução bastante mais atractiva. Além de ser economicamente mais viável, a fitorremediação oferece uma alternativa promissora uma vez que as plantas dominam naturalmente a maioria dos ecossistemas, usam a energia

solar, têm reservatórios com grande poder redutor, possuem extensos sistemas radiculares capazes de extrair uma variedade de iões metálicos e podem estabilizar e reabilitar ambientes danificados (Meagher, 1998).

Nos últimos anos observou-se um crescente interesse nas plantas que acumulam concentrações extremamente elevadas de metais nos seus tecidos e a sua investigação tem aumentado a sua potencial aplicação como agentes remediadores. O incentivo para a fitorremediação de mercúrio foi despoletado pelas recentes descobertas que mostram a produção de péptidos específicos por parte de algumas plantas, fitoquelatinas, que ligam e desintoxicam os tecidos de metais perigosos (Memon et al., 2001). Actualmente, existem estudos científicos sobre o possível aumento da remoção de metais pelas plantas como resultado do aumento da síntese de fitoquelatinas (Memon et al., 2001).

Como qualquer método de remediação ambiental, a fitorremediação tem algumas limitações, podendo ser morosa e ainda assim o local poderá não ficar completamente descontaminado (USEPA, 2000).

### **1.3.1 Tipos de Fitorremediação**

A fitorremediação de metais é uma tecnologia emergente e quatro tipos desta tecnologia têm sido explorados (Pilon-Smits et al., 2000): (1) Fitoextracção, em que as plantas acumuladoras de metais são usadas para absorver e concentrar os metais do solo nas partes aéreas. A biomassa colhida da planta resultante do processo do fitoextracção pode ser classificado como um desperdício perigoso, requerendo consequentemente a manipulação e a eliminação apropriadas (Kumar et al., 1995); (2) Rizofiltração, em que as raízes das plantas absorvem e concentram metais tóxicos de efluentes contaminados (Dushenkov et al., 1995). (3) Fitoestabilização, em que as plantas tolerantes aos metais são usadas para reduzir a mobilidade dos mesmos, diminuindo desse modo o risco de uma maior degradação ambiental quer pela dispersão dos metais quer pela sua disseminação atmosférica (Kumar et al., 1995). (4) Biorremediação sinérgica, em que as raízes da planta conjuntamente com microrganismos da rizosfera são usadas para descontaminação de solos contaminados com poluentes orgânicos (Walton et al., 1992).

### 1.3.2 Fitorremediação de mercúrio em zonas de sapal

Muitos estudos demonstraram que as raízes das espécies vegetais acumulam mercúrio quando crescem em solos contaminados com este metal (Coquery et al., 1994; Lenka et al., 1992; Ribeyre et al., 1994). Bizily et al. (1999) propôs um sistema de fitorremediação que efectuassem a eventual remoção do material vegetal que acumulou níveis elevados de mercúrio inorgânico. Algumas vantagens desta abordagem são a capacidade de imobilizar o mercúrio sem este interferir com o meio ambiente e a oportunidade de o reciclar, extraíndo-o das plantas colhidas.

A criação de estratégias de gestão que permitam sustentar a integridade biótica dos estuários é uma questão ambiental importante. Devido às características particulares dos sapais que dificultam a introdução de espécies não autóctones, as espécies de plantas identificadas como componentes fundamentais deste ecossistema surgem então como as candidatas perfeitas para o desenvolvimento de técnicas da remediação. A ligação entre a auto-remediação destas áreas e estas plantas pode permitir sustentar a integridade biótica de todo o sistema (Caçador et al., 1996; Caçador et al., 2000; Orson et al., 1992; Williams et al., 1994a).

Como já referido, as espécies colonizadoras de sapais pertencem a um grupo reduzido com características fisiológicas e morfológicas específicas que lhes permite sobreviver nestes ambientes particularmente adversos (Ernst, 1990). Foi já relatado que algumas espécies de sapal são capazes de reter partículas em suspensão da água e de as imobilizar nos sedimentos junto aos seus sistemas radiculares (Raskin, 1996). Outras espécies são ainda capazes de absorver grandes quantidades de contaminantes que são acumulados nas raízes ou translocados para as partes aéreas, promovendo a descontaminação dos sedimentos. Algumas espécies, tais como *Spartina alterniflora* ou *Phragmites australis*, foram descritas como hiperacumuladoras de metais (Windham et al., 2003); no entanto, o seu papel como potenciais biorremediadoras de sapal está pouco explorado.

## 1.4 Objectivos gerais do trabalho

A fitorremediação pode ser uma solução atractiva para a descontaminação, mas encontra-se ainda numa fase inicial de desenvolvimento, sendo necessária mais pesquisa de modo a aumentar o conhecimento sobre esta técnica e a sua aplicação de forma eficaz em diferentes tipos de ecossistemas. Por outro lado, as espécies usadas geralmente em processos de fitorremediação, tais como *Thlaspi caerulescens* e *Brassica juncea* não conseguem sobreviver às condições adversas das zonas de sapal. Assim, a descontaminação destes ecossistemas usando espécies de plantas endémicas poderá ser uma alternativa a considerar. No entanto, existem poucos estudos que avaliam a acumulação e o efeito do Hg em plantas de um modo geral, e em particular, em plantas de sapal, existindo por isso um conhecimento limitado sobre os mecanismos que estas plantas utilizam para tolerar o metal. O estudo dos mecanismos subjacentes à tolerância e acumulação dos metais nas plantas pode, em última análise, promover a optimização dos processos de fitorremediação. Assim, os objectivos propostos para este trabalho foram:

1. Comparar diferentes espécies de plantas de sapal em termos de acumulação, distribuição e compartimentação celular de mercúrio de modo a identificar o seu papel na mobilidade do metal no sapal bem como para avaliar o seu potencial de fitoremediação (Cap II).
2. Avaliar os níveis de stresse que as plantas experienciam através da análise de mecanismos de resposta antioxidante ao stresse imposto por mercúrio nas plantas e através da quantificação de parâmetros relacionados com a presença de stresse oxidativo (ROS e danos oxidativos) (Cap III).
3. Estudar os mecanismos de tolerância subjacentes à acumulação do mercúrio por plantas de sapal, nomeadamente agentes de complexação metálica (fitoquelatinas) (Cap IV).

# **Capítulo II**

---

## **Acumulação e distribuição de mercúrio em plantas de sapal**

---

---

### **1. Introdução**

#### **1.1 Acumulação e disponibilidade de mercúrio nos sedimentos**

Os sapais são particularmente vulneráveis à contaminação por mercúrio (Horvat et al., 1999; Hung e Chmura, 2006). Assim, têm sido efectuados vários estudos sobre a ocorrência, concentração e/ou distribuição de mercúrio nos sedimentos, na matéria particulada em suspensão e em diferentes organismos (Marins et al., 1997; Pereira et al., 2008;).

Existem vários factores que influenciam o grau de biodisponibilidade dos metais em sedimentos, tais como a granulometria das partículas, temperatura, reacções químicas como a dissolução/precipitação, adsorção-desorção e especiação metálica (Singh e Maclaughin, 1999; Zachara et al., 1992). No entanto, o pH, o potencial redox, a capacidade de troca catiónica (CEC), o conteúdo em matéria orgânica e a salinidade são os factores com maior influência na biodisponibilidade dos metais nos sedimentos (Jing et al., 2007; Williams et al., 1994a). Valores baixos de potencial redox implicam uma maior ligação dos metais aos sulfuretos nos sedimentos, ficando assim imobilizados (Greger, 1999). Por outro lado, Caçador et al. (1996) e Otte et al. (1993) verificaram que o potencial redox do

sedimento entre as raízes era mais elevado do que no sedimento sem raízes, o que pode ser devido à libertação de oxigénio por parte destas (Ernst, 1990). Baixos valores de pH aumentam a biodisponibilidade dos metais, visto que os iões de hidrogénio possuem uma grande afinidade para as cargas negativas dos colóides, competindo com os iões metálicos (Greger, 1999). No entanto, os sedimentos de sapal são simultaneamente uma fonte de retenção e de libertação de mercúrio (Zillioux et al., 1993). O aumento da mobilidade do mercúrio associado à matéria orgânica ocorre quando os sedimentos estão inundados. Este facto sugere que o mercúrio mineral e o mercúrio depositado atmosféricamente acumulado ao longo do tempo, podem ser remobilizados como resultado de alterações nos sistemas de sapal (Zillioux et al., 1993). Exposto isto, em condições de baixo hidrodinamismo como é o caso do sapal, quanto mais alcalinos forem os sedimentos e quanto maior for o conteúdo em matéria orgânica, mais fortemente estão ligados os metais e o seu tempo de permanência nos sedimentos aumenta igualmente (Beefink et al., 1982; Greger, 1999; Otte, 1991). A mobilidade dos metais nos sedimentos também é afectada pela salinidade, provocando uma mobilização dos metais (Otte 1991). Porém, a salinidade pode aumentar a formação de complexos de cloreto com catiões metálicos (como é o caso do mercúrio, cádmio e zinco), diminuindo a disponibilidade dos mesmos (Williams et al., 1994a). No entanto, a cinética destas interações, que ditam a extensão da biodisponibilidade do metal, ainda está fracamente compreendida (Singh e McLaughlin, 1999; Zachara et al., 1992), especialmente nos sedimentos de sapais.

A vegetação dos sapais tem um papel importante no aprisionamento do material particulado transportado na circulação estuarina e consequentemente dos metais que lhe estão associados (Chenhall et al., 1992). Os sedimentos colonizados por macrófitas possuem geralmente concentrações mais elevadas de metais pesados do que os sedimentos não colonizados (Caçador et al., 1996; Doyle e Otte, 1997). Tal facto deve-se à presença das raízes nos sedimentos, podendo induzir alterações nos ciclos dos metais através do transporte de exudados orgânicos, através dos seus tecidos aerenquimatosos para a zona radicular, responsáveis pela intensa actividade microbiana na rizosfera (Caçador, 1994; Giblin, 1986). Estas características levam à modificação do ambiente sedimentar na zona das raízes, facilitando a absorção de nutrientes e, consequentemente, de metais. Em particular, ressalta-se o transporte de oxigénio atmosférico da parte aérea das plantas para as raízes, que afecta a especiação dos metais nos sedimentos intertidais, podendo resultar



numa remobilização dos metais depositados, bem como numa alteração da sua biodisponibilidade (Lacerda et al., 1997; Sundby et al., 1998; Vale et al., 1990).

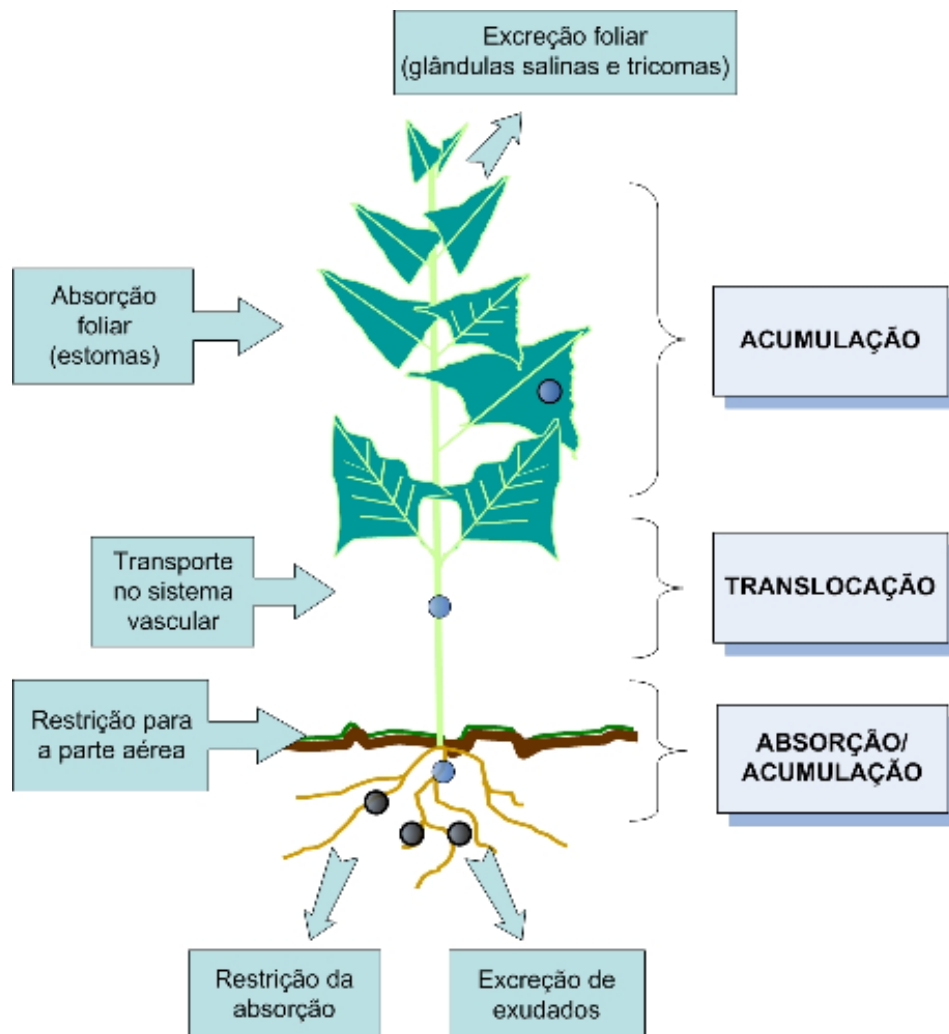
## **1.2 Absorção, translocação e acumulação de mercúrio nos tecidos vegetais**

A contaminação por metais das áreas de sapal reflecte-se nas concentrações destes elementos nas plantas que as colonizam (Otte, 1991; Rozema et al., 1985). As plantas de sapal, de um modo geral, acumulam diferentes quantidades de metais entre as partes aéreas e subterrâneas, apresentando uma maior retenção nas raízes (Ernst, 1990; Fitzgerald et al., 2003; Matheus et al., 2004; Otte, 1991). Uma vez que as espécies vegetais podem diferir nas taxas de absorção, translocação e excreção de metais, a dinâmica destes contaminantes nos sapais pode ser influenciada pela composição das comunidades vegetais aí presentes (Verkleij e Schat, 1989).

A concentração dos metais nos diversos órgãos das plantas resulta de processos de absorção e translocação a partir das raízes (Figura II-1), uma vez que estas acumulam grandes quantidades de metais (Singh e McLaughlin, 1999). Uma vez dentro da raiz, os iões metálicos chegam ao sistema xilémico via apoplasto e/ou simplasto (Przemeck e Haase, 1991; Salt, 1995; Senden et al., 1992, 1994). O processo de translocação dos metais do sistema radicular para a parte aérea vegetal é efectuado através de proteínas transportadoras que conduzem os metais do simplasto do parênquima xilémico para os vasos xilémicos e traqueídeos (Marschner, 1995). Uma vez nos órgãos aéreos, os metais são armazenados em compartimentos celulares, onde tenham uma interferência reduzida com os processos celulares vitais.

Foi já descrito que a acumulação de mercúrio em algumas plantas está relacionada com a sua concentração no sedimento e com a espécie vegetal em questão (Crowder, 1991). Alguns estudos revelaram que a absorção do Hg pode ser limitada pelas raízes, actuando como uma barreira entre a planta e o metal nos sedimentos (Boening, 2000; Patra e Sharma, 2000). Contudo, a absorção do Hg pelas plantas não pode ser totalmente relacionada com a concentração nos sedimentos, uma vez que existe igualmente uma troca de Hg entre a atmosfera e a vegetação (Lodenius et al., 2003). A deposição de Hg a nível foliar ocorre maioritariamente através da deposição gasosa, em que o metal é absorvido

pelos estomas, estando directamente relacionada com a transpiração das plantas (Marschner, 1995; Martin e Juniper, 1970). Além desta via, também se deve considerar a reintrodução do Hg no sistema foliar através da volatilização de  $\text{Hg}^0$  do solo (Patra e Sharma, 2000). Assim, uma vez que diferentes espécies de plantas acumulam diferentes quantidades de mercúrio (Kanerva et al., 1988) poder-se-á assumir que cada espécie participa com diferentes níveis de translocação e consequentemente com diferentes quantidades de mercúrio emitido para a atmosfera.



**Figura II-1:** Processos de absorção, translocação e acumulação de mercúrio em plantas vasculares (adaptado de Yang et al., 2005).

Com o intuito de sobreviverem em sedimentos contaminados com metais, as plantas de sapal desenvolveram vários mecanismos que regulam a sua concentração, onde se podem destacar os mecanismos de restrição da absorção e restrição do metal para os órgãos aéreos. Com excepção das plantas hiperacumuladoras, a maioria das plantas

restringe o movimento dos íons metálicos para os órgãos aéreos de modo a prevenir concentrações elevadas de metal nestes tecidos (MacFarlane e Burchett, 2000; Poschenrieder e Barceló, 2003; Vesik et al., 1999), uma vez que a entrada de metal pode induzir stresse (Carbonell et al., 1998), bem como promover a libertação dos metais da planta para o ambiente circundante. Outra forma que as plantas possuem de minimizar os efeitos nocivos dos metais passa pela imobilização destes nas paredes celulares (Sousa et al., 2008; Wang e Gregger, 2004). Uma vez no interior das células vegetais, os metais podem ser acumulados em compartimentos celulares como os vacúolos (Carrier et al., 2003) ou ligarem-se a moléculas orgânicas, nomeadamente aminoácidos, ácidos orgânicos e fitoquelatinas (Hall, 2002; Xiao et al., 2005), impedindo os metais de exercer a sua toxicidade.

O padrão de distribuição de metais entre os vários órgãos pode dar origem a importantes consequências ambientais. Os metais que são acumulados nos órgãos aéreos podem eventualmente ser excretados pelas folhas (Burke et al., 2000; Weis et al., 2002) ou acumulados nos detritos vegetais em decomposição (Windham et al., 2003) voltando ao sapal e representando uma potencial fonte de metais para o restante ecossistema (Dorgelo et al., 1995; Weis e Weis, 2004). Por outro lado, as plantas que acumulam concentrações mais elevadas de metais nos órgãos subterrâneos são mais eficazes na sua estabilização, contribuindo assim para uma redução na sua disponibilidade para o ecossistema (Doyle e Otte, 1997; Weis e Weis, 2004). Desta forma, as diferenças na distribuição e libertação dos metais entre espécies têm implicações na dinâmica e mobilidade dos metais nos sapais, enquanto sistemas de fitorremediação (Weis e Weis, 2004).

### 1.3 Objectivos

A acumulação de mercúrio entre várias espécies de plantas representativas de uma determinada área de sapal é fundamental para compreender o seu papel na mobilidade do mercúrio no ecossistema, providenciando novas perspectivas sobre a capacidade de fitorremediação destes ambientes.

O papel das plantas de sapal na descontaminação de mercúrio nestes ecossistemas bem como a compartimentação do metal nos vários órgãos são uma temática pouco explorada até à presente data. Assim, neste capítulo os objectivos são:

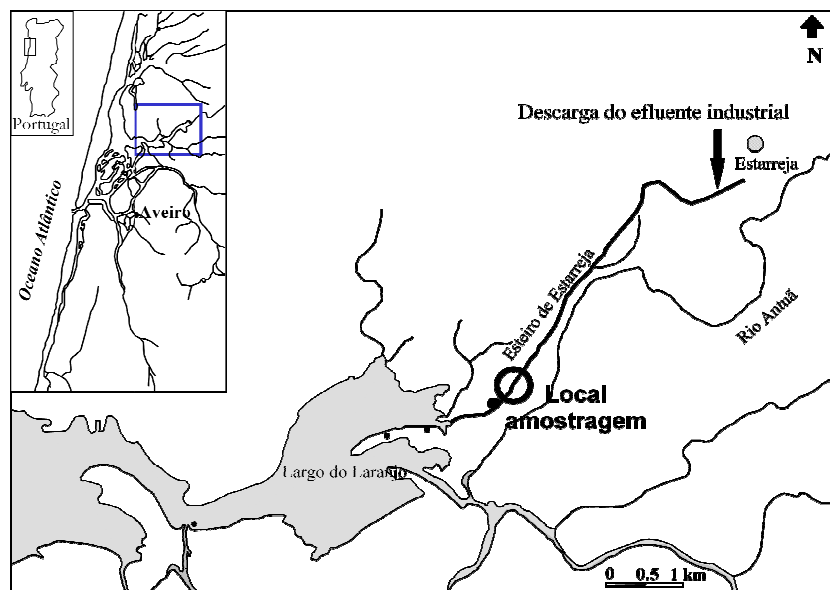
- Caracterizar os rizosedimentos do local de amostragem, em termos de parâmetros físico-químicos e de concentração de mercúrio
- Avaliar a influência dos parâmetros analisados na disponibilidade do metal para as diferentes plantas;
- Analisar as concentrações de mercúrio nos vários órgãos das plantas;
- Analisar a partição do metal entre as fracções celulares nos órgãos das várias plantas;
- Explorar as diferenças de absorção, acumulação e translocação do mercúrio nas várias plantas;
- Analisar o potencial de fitorremediação de mercúrio das diferentes espécies estudadas;

## **2. Material e Métodos**

### **2.1 Caracterização do local de amostragem**

A Ria de Aveiro estende-se ao longo da costa oeste da região centro de Portugal continental, abrangendo uma área com cerca de 45 km de comprimento, 8,5 km de largura máxima (Reis, 1993) e 2 km de largura média, ocupando uma área total de 51152 ha. Os sapais apresentam-se na Ria de Aveiro como um forte ecossistema, albergando uma grande diversidade de habitats, o que lhes confere uma elevada importância ecológica (Válega, 2002) (Figura II-1).

Como principal fonte de contaminação de toda a área envolvente da Ria destaca-se o complexo industrial químico de Estarreja. Desde a década de cinquenta até meados da década de noventa (Pereira et al., 1998), a Ria de Aveiro, e em particular o Largo do Laranjo, foram alvo de descargas directas do efluente de uma unidade produtora de cloro e soda cáustica localizada neste complexo, cujo fabrico se baseava na electrólise de salmoura recirculada de cloreto de sódio em células electrolíticas com cátodo de mercúrio e ânodo de grafite (Hall, 1985). O principal receptor desta contaminação foi o Esteiro de Estarreja, escolhido para este trabalho como local de amostragem. O Esteiro de Estarreja é um canal com cerca de 4500 m de comprimento e uma largura que varia entre 10 e 30 m. Este canal tem início no Cais de Estarreja e termina à entrada do Largo do Laranjo, apresentando uma forma em “V”. A profundidade do canal varia entre 1.5 e 2 m, principalmente na parte central do Esteiro. As margens são constituídas por lodos escuros, de granulometria geralmente fina e encontram-se colonizadas por várias espécies vegetais. Em situação de baixa-mar as margens ficam completamente a descoberto e apenas a parte central mantém uma altura de água de 0,5 m (Pereira, 1996).



**Figura II-1:** Enquadramento geral da Ria de Aveiro no território nacional. Círculo negro representa o local de amostragem – Estuário de Estarreja.





Pereira e Duarte (1994) publicaram dados relativos à variabilidade das concentrações de mercúrio nos sedimentos e de mercúrio dissolvido na água ou associado à matéria suspensa, em cinco locais do Estuário de Estarreja. As concentrações de mercúrio dissolvido na água variavam entre 0 e 4,9 ppb e eram superiores junto do ponto de descarga do efluente. A concentração de mercúrio associado à matéria em suspensão na água variava entre 31,4 e 328,1 ppm, ocorrendo os maiores valores num local a cerca de 2000 m do ponto de descarga do efluente industrial. Os sedimentos apresentavam concentrações de mercúrio elevadas ao longo de todo o Estuário (entre 58 e 536 ppm), sendo os valores mais elevados também encontrados a cerca de 2000 m da descarga do efluente industrial. No que diz respeito à qualidade do ar, os níveis de mercúrio atmosférico em Estarreja eram muito superiores aos que se verificam em Aveiro, podendo estes últimos ser tomados como valores de base (Pio et al., 1986).

## 2.2. Espécies vegetais usadas

As espécies utilizadas neste trabalho foram *Atriplex patula* L.; *Halimione portulacoides* (L.) Aellen; *Juncus maritimus* L. e *Phragmites australis* (Cav.) Steudel. A escolha recaiu sobre estas plantas, uma vez que são características do sapal da Ria de

Aveiro, existem em abundância no local de amostragem e são bastante diferentes entre si, nomeadamente no que concerne ao seu ciclo de vida. Uma breve descrição sobre as características mais importantes destas espécies encontra-se na Tabela II-1.

**Tabela II-1:** Descrição das plantas usadas neste trabalho \*

Nome da espécie	Esquema	Família	Género	Características gerais
<i>Atriplex patula</i> L.		Chenopodiaceae	<i>Atriplex</i> L.	Espécie anual Floração: Julho a Outubro Distribuição: zona centro e sul litoral Sapal superior
<i>Halimione portulacoides</i> (L.) Aellen		Chenopodiaceae	<i>Halimione</i> L.	Espécie perene Floração: Agosto a Novembro Distribuição: locais salinos do litoral Sapal médio
<i>Juncus maritimus</i> L.		Juncaceae	<i>Juncus</i> L.	Espécie vivaz Floração: Julho a Outubro Distribuição: costa atlântica europeia Sapal superior
<i>Phragmites australis</i> (Cav.) Steudel		Poaceae	<i>Phragmites</i> Adans.	Espécie vivaz Floração: Julho a Setembro Distribuição: todo o território português Sapal superior

\* descrição das plantas apresentadas está de acordo com Franco (1971).



## **2.3 Colheita de sedimentos e plantas**

As amostras de sedimentos e plantas foram recolhidas na Primavera de 2006 durante a maré baixa numa das margens do Esteiro de Estarreja. Foram recolhidas pelo menos três réplicas de cada planta bem como três réplicas de sedimentos na zona da raiz de cada planta (rizosedimentos). As amostras de sedimentos e plantas foram colocadas em sacos de plástico e imediatamente transportadas para o laboratório.

## **2.4 Determinação dos parâmetros físico-químicos dos sedimentos**

### **2.4.1 Determinação do teor em água**

A determinação do teor em água dos sedimentos foi realizada pesando cerca de 5 g de sedimento, em cadinhos de porcelana e colocando-os de seguida numa estufa a 120°C, até o peso se manter constante. Os cadinhos foram posteriormente retirados da estufa e colocados num exsiccador até arrefecerem, tendo sido pesados no final. O teor em água foi determinado pela perda de peso a 120°C e o seu valor expresso em percentagem.

### **2.4.2 Determinação do teor em matéria orgânica**

Para se proceder à determinação do teor de matéria orgânica nos sedimentos colocaram-se os cadinhos usados na determinação do teor em água, previamente pesados, numa mufla a 500°C durante 4 horas. Seguidamente, os cadinhos foram retirados da mufla e colocados num exsiccador até arrefecerem. Depois de arrefecidos, os cadinhos foram pesados e o teor de matéria orgânica foi calculado pela perda de peso entre 120°C e 500°C e expresso em percentagem.

### **2.4.3 Determinação do pH e do potencial redox (Eh)**

A determinação do pH e do potencial redox foram efectuados *in situ* usando um aparelho de campo (WTW – pH 3301 meter). O pH foi medido após um curto período de estabilização e o potencial redox foi medido após um período de estabilização de 15 minutos.

## **2.5 Determinação da biomassa aérea vegetal**

A biomassa aérea para cada espécie foi determinada cortando a vegetação ao nível do sedimento em três quadrados de 0,23 m x 0,23 m. O material colhido foi transportado para o laboratório, lavado com água destilada e seco a 70°C. A biomassa foi expressa em g de peso seco por m<sup>2</sup>.

## **2.6 Determinação da concentração de mercúrio total**

### **2.6.1 Concentração de mercúrio total nos sedimentos**

Os sedimentos destinados à determinação da concentração de mercúrio foram secos a 45°C e posteriormente desagregados, homogeneizados e passados por um peneiro de malha 1 mm de forma a retirar as raízes.

A técnica usada para a análise de mercúrio total nos sedimentos foi a espectrofotometria de absorção atômica com decomposição térmica da amostra (Leco, modelo AMA-Advanced Mercury Analyser, 254), que não requer tratamento prévio da amostra. As amostras secas e homogeneizadas foram colocadas num recipiente de combustão previamente limpo que foi inserido num tubo catalítico de combustão feito em quartzo. As amostras foram secas a 120°C antes da sua combustão a 680-700°C numa atmosfera de oxigénio. O vapor de mercúrio foi recolhido numa amálgama de ouro e após um período de espera foi aquecido a 900°C. O mercúrio libertado foi transportado para uma cuvette aquecida (120°C), onde se procedeu à quantificação do mercúrio. A resposta do equipamento foi verificada diariamente através da análise de materiais de referência

certificados com matrizes semelhantes às amostras. Os materiais de referência usados para os sedimentos foram IEAE-356 (material de referência de sedimentos marinhos contaminados proveniente da Agência Internacional de Energia Atômica), PACS 2 e Mess-3 (materiais de referência de sedimentos marinhos provenientes do Conselho Nacional de Investigação do Canadá). Todas as quantificações de mercúrio foram efectuadas em triplicado e o coeficiente de variação foi sempre inferior a 10%. Entre amostras foram sempre efectuados brancos de modo a evitar possíveis contaminações. A correcção dos resultados foi efectuada tendo por base a recuperação obtida para os materiais de referência. As taxas de recuperação obtidas encontraram-se entre os 80% e 120%.

### **2.6.2 Concentração de mercúrio total nas plantas**

As plantas foram lavadas com água destilada de modo a remover partículas de sedimento aderentes e imediatamente imersas numa solução de 5 mM de  $\text{CaCl}_2$  durante 5 minutos (Mewly e Rauser, 1992) para remover o mercúrio adsorvido à superfície da planta. As plantas foram divididas nos vários órgãos (folhas, caules, raízes e rizomas) e consequentemente pesadas e congeladas a  $-80^\circ\text{C}$ .

Para a quantificação do mercúrio total, porções dos vários órgãos foram secos a  $45^\circ\text{C}$  e homogeneizados por moagem. A quantificação do mercúrio total foi efectuada como descrito para a quantificação do mercúrio total nos sedimentos, usando como material de referência o BCR-60 (material de referência de homogeneizados de plantas aquáticas proveniente do Gabinete Comunitário de Referência). Todas as quantificações foram efectuadas em triplicado.

### **2.6.3 Concentração de mercúrio nas fracções solúvel e insolúvel nas plantas**

Para a quantificação do Hg solúvel e insolúvel, as plantas foram divididas nos vários órgãos, pesadas e congeladas a  $-80^\circ\text{C}$ . O protocolo de extracção descrito por Rauser (2000) foi utilizado com ligeiras modificações. As amostras congeladas foram homogeneizadas em azoto líquido num almofariz com tampão de homogeneização (100 mM HEPES pH 8,6; 1 mM PMSF; 0,2% Tween 20 (v/v)) numa razão de 1 g de material

vegetal para 1 ml de tampão de homogeneização. O material extraído foi centrifugado a 50000 g durante 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi recolhido e mantido em gelo. O resíduo obtido foi então ressuscitado em tampão de extracção composto por 10 mM HEPES pH 8,6; 0,04% Tween 20 (v/v) numa razão de 1 g de material para 1,5 ml de tampão de extracção. A amostra foi novamente centrifugada e o sobrenadante resultante foi adicionado ao sobrenadante anterior. Os procedimentos de ressuspensão e centrifugação foram repetidos mais quatro vezes até se obterem 6 extractos. O resíduo obtido corresponde então ao mercúrio fortemente ligado às paredes celulares e membranas dos organelos, enquanto que os extractos 1 a 6 correspondem ao mercúrio solúvel, ou seja, ao mercúrio citosólico nas plantas. Os extractos foram liofilizados e ressuscitados em 5 ml de 0,2% Tween 20 (v/v). Os sedimentos resultantes foram igualmente liofilizados. Os sobrenadantes e os resíduos constituem respectivamente a fracção solúvel (citosólica) e a fracção insolúvel (correspondente às paredes e membranas dos organelos celulares). Estas fracções foram directamente analisadas por espectrofotometria de absorção atómica com decomposição térmica, usando o equipamento referido anteriormente. Os resíduos foram analisados como já descrito para a quantificação do mercúrio nos sedimentos e nas plantas. Uma vez que a fracção solúvel são amostras líquidas, as condições de operação do equipamento são diferentes. Assim, para estas amostras as condições foram as seguintes: tempo de secagem: 350–700 s (dependendo do volume de amostra: 500–1000 µl); tempo de decomposição: 150 s; tempo de espera: 40 s. Todas as quantificações foram efectuadas em duplicado ou triplicado. O material de referência utilizado foi o BCR-60.

## 2.7 Tratamento estatístico

Para todas as análises efectuadas, o grau de significância estatística dos resultados foi determinado com base no teste da ANOVA uni ou bifactorial para valores de significância de  $P < 0,05$ . O tratamento estatístico foi realizado na totalidade pelo programa SigmaStat 3.5.

### 3. Resultados

#### 3.1 Parâmetros físico-químicos dos sedimentos

As propriedades físico-químicas dos rizosedimentos das várias plantas em estudo estão apresentadas na Tabela II-2.

**Tabela II-2:** Parâmetros físico-químicos dos rizosedimentos de *A. patula*, *H. portulacoides*, *J. maritimus* e *P. australis* no Esteiro de Estarreja. Os valores são médias  $\pm$  desvio padrão de 3 réplicas.\*

Espécies	pH	Potencial redox (mV)	Conteúdo em água (%)	Matéria orgânica (%)
<i>A. patula</i>	6,78 $\pm$ 0,06 <sup>a</sup>	139,0 $\pm$ 20,8 <sup>a</sup>	28,7 $\pm$ 0,2 <sup>a</sup>	7,9 $\pm$ 0,5 <sup>a</sup>
<i>H. portulacoides</i>	6,82 $\pm$ 0,24 <sup>a</sup>	147,0 $\pm$ 24,1 <sup>a</sup>	56,2 $\pm$ 0,3 <sup>b</sup>	12,6 $\pm$ 0,1 <sup>b</sup>
<i>J. maritimus</i>	6,76 $\pm$ 0,16 <sup>a</sup>	146,0 $\pm$ 37,4 <sup>a</sup>	48,9 $\pm$ 2,8 <sup>c</sup>	10,3 $\pm$ 1,4 <sup>a,b</sup>
<i>P. australis</i>	6,92 $\pm$ 0,12 <sup>a</sup>	-121,7 $\pm$ 2,5 <sup>b</sup>	31,2 $\pm$ 0,6 <sup>a</sup>	20,0 $\pm$ 0,2 <sup>c</sup>

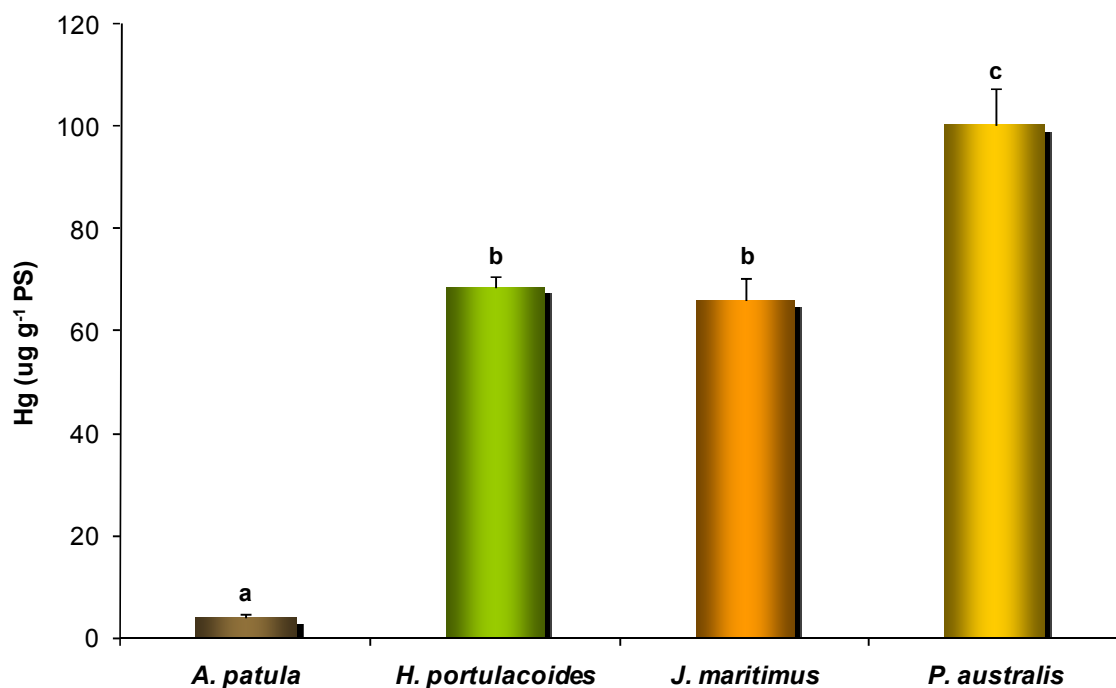
\*os valores, na mesma coluna, seguidos da mesma letra não apresentam diferenças significativas entre si ( $P > 0,05$ )

Comparando os valores de pH das diferentes rizosferas, verifica-se que não apresentaram diferenças significativas ( $P > 0,05$ ). É possível afirmar que o pH de todas as rizosferas foi neutro, observando-se o valor máximo de 6,92 e o valor mínimo de 6,76 em *P. australis* e *J. maritimus*, respectivamente. No que se refere ao potencial redox verifica-se que os valores foram semelhantes entre si, com excepção do rizosedimento de *P. australis* que exibiu um valor significativamente mais baixo (-121,7 mV) ( $P < 0,05$ ). Analisando o conteúdo em água, é perceptível uma diferença significativa entre os sedimentos de *J. maritimus* e *H. portulacoides*, relativamente às outras espécies, apresentando os valores mais elevados (48,9% e 56,2%, respectivamente) ( $P < 0,05$ ). Em

relação ao conteúdo em matéria orgânica verificaram-se diferenças significativas entre as espécies ( $P < 0,05$ ), destacando-se *P. australis* por apresentar maior percentagem de matéria orgânica na sua rizosfera e *A. patula* por apresentar o valor mais baixo (7,9%).

### 3.2 Hg nos sedimentos

Na Figura II-3 encontram-se as concentrações de mercúrio presentes nos rizosedimentos das várias espécies vegetais em estudo.



**Figura II-3:** Concentração total de mercúrio ( $\mu\text{g g}^{-1}$  peso seco) nos rizosedimentos colonizados por *A. patula*, *H. portulacoides*, *J. maritimus* e *P. australis* no Esteiro de Estarreja. Os valores são médias  $\pm$  erro padrão de pelo menos 3 réplicas. Letras iguais significam ausência de diferenças significativas entre si ( $P > 0,05$ )

Verificaram-se diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) nos níveis de mercúrio entre os rizosedimentos das várias plantas, com exceção de *H. portulacoides* e *J. maritimus*. O sedimento de *P. australis* foi aquele que apresentou valores mais elevados de Hg ( $100,3 \mu\text{g g}^{-1}$ ), sendo o sedimento de *A. patula*, o que apresentou o valor mais baixo de concentração de mercúrio ( $3,9 \mu\text{g g}^{-1}$ ).

### 3.3 Hg nas plantas

#### 3.3.1 Acumulação de Hg total

As concentrações de Hg total presentes nos vários órgãos das diferentes espécies vegetais em estudo encontram-se na Tabela II-3.

**Tabela II-3:** Concentrações de mercúrio total ( $\mu\text{g g}^{-1}$  peso seco) nos diferentes órgãos de *A. patula*, *H. portulacoides*, *J. maritimus* e *P. australis* colhidas no Esteiro de Estarreja. Os valores são médias  $\pm$  erro padrão de pelo menos 3 réplicas. \*

Espécies	Folha	Caule	Rizoma	Raiz
<i>A. patula</i>	0,092 $\pm$ 0,009 <sup>a</sup>	0,039 $\pm$ 0,009 <sup>a</sup>	—	0,061 $\pm$ 0,001 <sup>a,h</sup>
<i>H. portulacoides</i>	0,902 $\pm$ 0,071 <sup>b</sup>	0,359 $\pm$ 0,042 <sup>b</sup>	—	0,602 $\pm$ 0,203 <sup>b,h</sup>
<i>J. maritimus</i>	0,255 $\pm$ 0,038 <sup>c,g</sup>	—	7,368 $\pm$ 0,601 <sup>d</sup>	4,251 $\pm$ 0,886 <sup>d</sup>
<i>P. australis</i>	0,188 $\pm$ 0,029 <sup>c,g</sup>	—	0,521 $\pm$ 0,080 <sup>e</sup>	12,991 $\pm$ 2,417 <sup>f</sup>

\*os valores, na mesma linha e na mesma coluna, seguidos da mesma letra não apresentam diferenças significativas entre si ( $P > 0,05$ )

Efectuando uma análise comparativa entre as diferentes plantas, foi possível observar diferenças nos níveis de mercúrio acumulado entre as diferentes espécies.

Comparando os órgãos dentro da mesma espécie, verifica-se que *A. patula* e *H. portulacoides* não apresentaram diferenças significativas entre os seus órgãos ( $P > 0,05$ ). No entanto, *J. maritimus* acumulou significativamente mais mercúrio ( $P < 0,05$ ) nos órgãos subterrâneos enquanto que em *P. australis* foi a raiz que acumulou significativamente mais mercúrio ( $P < 0,05$ ) relativamente aos restantes órgãos.

No que diz respeito à acumulação de Hg no mesmo órgão entre as diferentes espécies, é possível observar que nas folhas foi *H. portulacoides* que acumulou significativamente mais mercúrio (0,902  $\mu\text{g g}^{-1}$  peso seco) ( $P < 0,05$ ) e *A. patula* a que

apresentou valores de mercúrio significativamente mais baixos ( $0,092 \mu\text{g g}^{-1}$  peso seco) ( $P < 0,05$ ). Nos caules, *H. portulacoides* acumulou níveis significativamente mais elevados de Hg ( $P < 0,05$ ) relativamente a *A. patula* e nos rizomas foi *J. maritimus* que apresentou as concentrações mais elevadas de Hg em comparação com *P. australis* ( $P < 0,05$ ). Por último, analisando as raízes, observa-se que *P. australis* foi a espécie que mais mercúrio acumulou ( $P < 0,05$ ) e *A. patula* e *H. portulacoides* apresentaram os níveis mais baixos de Hg ( $P < 0,05$ ).

### 3.3.2 Absorção, acumulação e translocação de Hg

Na Tabela II-4 estão expressos os factores de absorção, acumulação e translocação de mercúrio para cada uma das espécies estudadas.

**Tabela II-4:** Factores de absorção, acumulação e translocação de mercúrio em *A. patula*, *H. portulacoides*, *J. maritimus* e *P. australis* colhidas no Esteiro de Estarreja. Factor de absorção: razão da concentração de Hg entre raiz e sedimento (R/sed). Factor de acumulação: razão da concentração de Hg entre parte aérea e sedimento (PA/sed); entre parte subterrânea e sedimento (PS/sed). Factor de translocação: razão da concentração de Hg entre folha e raiz (F/R); entre caule e raiz (C/R); entre rizoma e raiz (Rz/R); entre parte aérea e raiz (PA/R) e entre parte aérea e parte subterrânea (PA/PS). \*

Espécies	F. absorção	F. acumulação		F. translocação				
	R/sed	PA/sed	PS/sed	F/R	C/R	Rz/R	PA/R	PA/PS
<i>A. patula</i>	0,022 <sup>a</sup>	0,0165 <sup>a</sup>	0,0218 <sup>a</sup>	1,514 <sup>a</sup>	0,647 <sup>a</sup>		1,045 <sup>a</sup>	1,045 <sup>a</sup>
<i>H. portulacoides</i>	0,009 <sup>a,b</sup>	0,0083 <sup>b</sup>	0,0088 <sup>a</sup>	2,260 <sup>a</sup>	0,900 <sup>a</sup>		1,430 <sup>a</sup>	1,430 <sup>a</sup>
<i>J. maritimus</i>	0,064 <sup>a,c</sup>	0,0039 <sup>c</sup>	0,1049 <sup>b</sup>	0,060 <sup>b</sup>		1,733 <sup>a</sup>	0,060 <sup>b</sup>	0,037 <sup>b</sup>
<i>P. australis</i>	0,130 <sup>c</sup>	0,0019 <sup>c</sup>	0,0151 <sup>a</sup>	0,018 <sup>b</sup>		0,051 <sup>b</sup>	0,018 <sup>b</sup>	0,133 <sup>b</sup>

\*os valores, na mesma coluna, seguidos da mesma letra não apresentam diferenças significativas entre si ( $P > 0,05$ )

O factor de absorção representa a razão entre a concentração de mercúrio total na raiz (R) e no rizosedimento (sed). O factor de acumulação reflecte a razão entre a concentração de mercúrio nas porções aérea (PA) e subterrânea (PS) de cada planta e no rizosedimento. O factor de translocação representa a razão entre a concentração de Hg nos



diferentes órgãos (folha, caule e rizoma) e a concentração de Hg na raiz e também a razão entre a concentração de Hg nas porções aérea (PA) e subterrânea (PS).

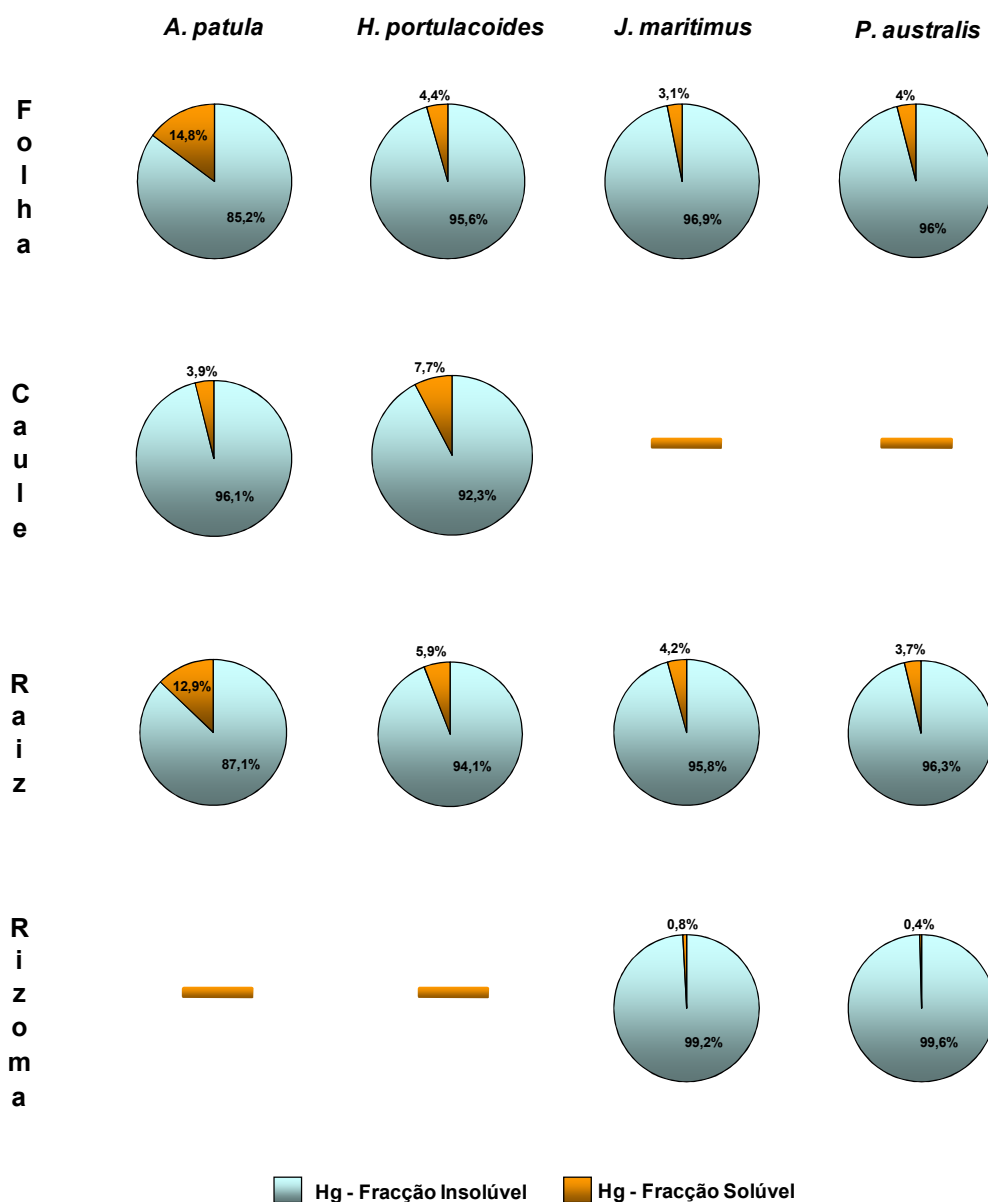
Analisando a concentração de mercúrio na raiz de cada planta em relação ao seu rizosedimento, verifica-se que o factor de absorção, em todas as plantas, apresentou valores muito baixos, demonstrando que a concentração de mercúrio das raízes foi muito inferior à encontrada nos sedimentos. Contudo, observa-se que as plantas que apresentaram maiores factores de absorção foram *J. maritimus* e *P. australis* ( $P < 0,05$ ). *H. portulacoides* foi a espécie que apresentou o menor factor de absorção face às outras espécies ( $P < 0,05$ ).

Comparando as diferentes plantas no que diz respeito ao factor de acumulação, observa-se, uma vez mais, que em todas as plantas os factores de acumulação apresentaram valores muito baixos. No que concerne ao factor de acumulação PA/sed, existiram diferenças significativas entre as espécies ( $P < 0,05$ ). *A. patula* apresentou o factor de acumulação mais elevado ( $P < 0,05$ ) enquanto que as monocotiledóneas *J. maritimus* e *P. australis* apresentaram os valores mais baixos ( $P < 0,05$ ). Analisando o factor de acumulação PS/sed, verificou-se que não existiram diferenças significativas ( $P > 0,05$ ), com excepção de *J. maritimus* que apresentou o factor de acumulação mais elevado ( $P < 0,05$ ).

Após analisar os vários factores de translocação para todas as plantas, é possível afirmar que estas apresentaram comportamentos diferentes. Relativamente ao factor de translocação F/R observa-se que as dicotiledóneas *A. patula* e *H. portulacoides* apresentaram valores significativamente mais elevados do que as monocotiledóneas ( $P < 0,05$ ). Observando os factores de translocação C/R e Rz/R é possível afirmar que as dicotiledóneas apresentaram valores semelhantes ( $P > 0,05$ ) e *J. maritimus* apresentou valores superiores a *P. australis* ( $P < 0,05$ ). Por último, nos factores de translocação PA/R e PA/PS observam-se tendências semelhantes, havendo diferenças entre dicotiledóneas e monocotiledóneas. *A. patula* e *H. portulacoides* exibiram os factores de translocação mais elevados ( $P < 0,05$ ), enquanto que *J. maritimus* e *P. australis* apresentaram os valores mais baixos ( $P < 0,05$ ).

### 3.3.3 Acumulação de Hg nas fracções solúvel e insolúvel

Na Figura II-4 encontra-se expressa em percentagem a partição do mercúrio relativamente ao mercúrio total presente em cada órgão das várias plantas.



**Figura II-4:** Distribuição do mercúrio entre as fracções insolúvel e solúvel em relação ao mercúrio total acumulado (%) nos órgãos de *A. patula*, *H. portulacoides*, *J. maritimus* e *P. australis* colhidas no Esteiro de Estarreja.

Relativamente à distribuição do Hg nas fracções solúvel e insolúvel verificou-se que em todas as plantas, a maioria do mercúrio (mais de 85%) encontra-se ligado à fracção

insolúvel. Contudo, a percentagem de Hg na fracção solúvel e insolúvel não se manteve constante entre os órgãos da mesma espécie nem entre as diferentes espécies. *A. patula* apresentou na folha e raiz percentagens maiores de Hg na fracção solúvel ( $P < 0,05$ ) e *H. portulacoides* acumulou preferencialmente maiores percentagens de Hg solúvel no caule e na raiz ( $P < 0,05$ ). *J. maritimus* e *P. australis* apresentaram percentagens de mercúrio semelhantes entre os seus próprios órgãos ( $P > 0,05$ ). Comparando o mesmo órgão entre as diferentes espécies, *A. patula* foi a planta que exibiu a maior percentagem de Hg solúvel na folha (14,8%) ( $P < 0,05$ ) e na raiz (12,9%) em comparação com as outras espécies. *H. portulacoides* apresentou maior percentagem de Hg solúvel no caule ( $P < 0,05$ ). Em *J. maritimus* e *P. australis* obtiveram-se percentagens de mercúrio solúvel muito reduzidos, ou seja, sempre inferiores a 5%, sendo o rizoma o órgão que menos mercúrio acumulou na fracção solúvel ( $P < 0,05$ ).

### 3.3.4 Partição do Hg nas fracções intracelulares

Com o objectivo de averiguar diferenças na compartimentação celular do mercúrio nas várias espécies vegetais, foram determinadas as razões entre as concentrações de mercúrio das fracções insolúvel e solúvel para todos os órgãos. Assim, na Tabela II-5 encontram-se expressos os vários factores de partição para todas as plantas.

Verifica-se que as dicotiledóneas apresentaram diferenças significativas entre os seus órgãos ( $P < 0,05$ ), apresentando *A. patula* o factor de partição mais elevado na folha ( $P < 0,05$ ) e *H. portulacoides* no caule ( $P < 0,05$ ). Por outro lado, as monocotiledóneas apresentaram razões mais baixas, significando que a concentração de mercúrio presente nas fracções insolúveis foi superior quando comparada com as solúveis. É de destacar, nestas duas espécies, o rizoma que exibiu valores significativamente mais baixos quando comparado com os outros órgãos ( $P < 0,05$ ).

No caso das folhas, não existiram diferenças significativas entre as espécies, com excepção de *A. patula* que apresentou um factor de partição significativamente mais elevado ( $P < 0,05$ ), apresentando assim uma maior percentagem de mercúrio na fracção solúvel relativamente à insolúvel.

**Tabela II-5:** Factor de partição de mercúrio em *A.patula*, *H. portulacoides*, *J. maritimus* e *P.australis* colhidas no Esteiro de Estarreja. Factor de partição: razão entre a concentração de Hg na fracção solúvel e insolúvel.\*

Espécies	Factor partição			
	Folha	Caule	Rizoma	Raiz
<i>A.patula</i>	0,174 <sup>a</sup>	0,041 <sup>b,l</sup>		0,148 <sup>c</sup>
<i>H. portulacoides</i>	0,046 <sup>d,k</sup>	0,084 <sup>e,l</sup>		0,063 <sup>f</sup>
<i>J. maritimus</i>	0,032 <sup>g,k</sup>		0,006 <sup>h,m</sup>	0,043 <sup>g,n</sup>
<i>P. australis</i>	0,041 <sup>i,k</sup>		0,004 <sup>j,m</sup>	0,038 <sup>i,n</sup>

\*os valores, na mesma linha e na mesma coluna, seguidos da mesma letra não apresentam diferenças significativas entre si ( $P > 0,05$ )

Nos caules e rizomas não existiram diferenças significativas entre as espécies ( $P > 0,05$ ). Por último no que concerne à raiz, observa-se novamente uma diferença entre os dois grupos de plantas. As dicotiledóneas foram as plantas que apresentaram factores significativamente mais elevados ( $P < 0,05$ ), enquanto que as monocotiledóneas, além de apresentarem percentagens de mercúrio mais elevadas na fracção insolúvel (factor de partição mais baixo), não apresentaram diferenças significativas entre si ( $P > 0,05$ ).

### 3.3.5 “Pools” de Hg na parte aérea

Na Tabela II-6 encontram-se expressos os valores de acumulação de mercúrio para cada uma das plantas estudadas, tendo em consideração a biomassa aérea de cada uma delas.

**Tabela II-6:** Acumulação de Hg ( $\mu\text{g m}^{-2}$ ) nas porções aéreas em áreas colonizadas por *A. patula*, *H. portulacoides*, *J. maritimus* e *P. australis* no Esteiro de Estarreja. Os valores são médias  $\pm$  erro padrão de 3 réplicas. Letras iguais significam que não existem diferenças significativas entre si ( $P > 0,05$ ).

	<i>A. patula</i>	<i>H. portulacoides</i>	<i>J. maritimus</i>	<i>P. australis</i>
Hg ( $\mu\text{g m}^{-2}$ )	28,6 $\pm$ 1,89 <sup>a</sup>	368,8 $\pm$ 15,63 <sup>b</sup>	274,9 $\pm$ 61,78 <sup>b</sup>	338,1 $\pm$ 52,89 <sup>b</sup>

Apesar de se terem verificado diferenças significativas na concentração de Hg entre os seus órgãos, a quantidade de Hg acumulado por área não foi significativamente diferente entre as espécies ( $P > 0,05$ ), com excepção de *A. patula*. Assim, *H. portulacoides*, *J. maritimus* e *P. australis* acumularam concentrações de Hg superiores a  $270 \mu\text{g m}^{-2}$  e *A. patula* apresentou valores significativamente inferiores ( $28,6 \mu\text{g m}^{-2}$ ) ( $P < 0,05$ ).

## 4. Discussão

### 4.1 Mercúrio nos sedimentos e a sua biodisponibilidade

As concentrações de metais nos sedimentos de sapal não são uniformes, apresentando variações bastante grandes entre sapais bem como dentro do mesmo sapal (Silva, 2000). A disponibilidade do Hg para os organismos é determinada pela sua actividade na solução do sedimento que, por sua vez, é controlada pelas características das fracções líquidas e sólidas do sedimento. Como consequência, a disponibilidade do Hg pode variar consideravelmente, dependendo da natureza dos processos de adsorção-desorção que ocorrem nos sedimentos. Os factores ambientais com maior influência na biodisponibilidade do mercúrio são as espécies de Hg presentes, a concentração de iões cloreto, o pH, a capacidade de troca catiónica, o potencial redox e o conteúdo em matéria orgânica (Jing et al., 2007).

O pH de um sedimento afecta significativamente o desenvolvimento das plantas em termos de disponibilidade de nutrientes essenciais. No entanto, pode igualmente causar alterações na solubilidade e especiação dos metais, podendo resultar num fluxo de Hg dos sedimentos para as águas intersticiais e consequentemente num aumento da absorção pelas plantas (Harter, 1983; Reddy e Patrick, 1977; Weis e Weis, 2004). Os valores de pH dos rizosedimentos das quatro plantas apresentam-se próximo de 7, não havendo diferenças significativas entre elas (Tabela II-2). Estes valores corroboram outros estudos já efectuados que demonstram que o pH de sedimentos de sapal varia normalmente entre 6,5 a 7,5, favorecendo a imobilização dos metais nos sedimentos (Gambrell, 1994). Tal facto sugere que as plantas estudadas não alteram os valores de pH dos seus rizosedimentos.

Nos sapais, o potencial redox é de especial importância devido à influência das marés (Greger, 1999). Este parâmetro mede a tendência de um sedimento para receber ou fornecer electrões e é controlado pelo tipo de substâncias redutoras e oxidantes que ele contém. Para valores negativos de potencial redox ( $Eh \leq -150$  mV), a grande quantidade sulfuretos presentes tende a precipitar os metais. Por outro lado, para valores positivos ( $\geq 200$  mV), os sulfatos são a forma predominante e o ferro e o manganês podem ocorrer como hidróxidos insolúveis. Deste modo, a gama entre -150 e 200 mV é considerada como o intervalo onde é mais provável que os metais estejam mais disponíveis (Jackson, 1998).

Assim sendo, os valores de potencial redox determinados sugerem que o mercúrio existente nas rizosferas se encontra disponível para todas as espécies vegetais (Tabela II-2).

A carga orgânica dos sedimentos é função da natureza dos afluentes dominantes, do tipo de vegetação e do grau de decomposição (Williams et al., 1994a). Assim e sabendo que o mercúrio de um modo geral se encontra fortemente ligado à matéria orgânica dos sedimentos, o mercúrio no rizosedimento colonizado por *A. patula* (7,9%) poderá estar mais disponível do que no sedimento colonizado por *P. australis* (20,0%) uma vez que apresenta um menor conteúdo em matéria orgânica.

Relativamente ao mercúrio nos rizosedimentos, observam-se diferentes concentrações de mercúrio nos rizosedimentos colonizados pelas plantas estudadas, variando entre 3,9  $\mu\text{g Hg g}^{-1}$  no sedimento colonizado por *A. patula* e 100,3  $\mu\text{g Hg g}^{-1}$  no sedimento colonizado por *P. australis* (Figura II-3). Estas diferenças podem dever-se, pelo menos em parte, ao facto de as plantas se localizarem em diferentes alturas na margem do canal do Esteiro de Estarreja, sendo que *P. australis* se encontra na zona inferior do margem, logo mais sujeita às diferenças de maré, enquanto que *A. patula* se encontra na zona superior da margem, estando menos sujeita à influencia das marés. *J. maritimus* e *H. portulacoides* localizam-se na zona intermédia, daí apresentarem concentrações intermédias de mercúrio (66,1 e 68,5  $\mu\text{g Hg g}^{-1}$  peso seco, respectivamente). No entanto, estes resultados sugerem também que, possivelmente, cada planta responde de modo diferente à exposição ao metal, sendo capaz de alterar a sua concentração na rizosfera. Este facto é de particular importância, uma vez que realça o papel de cada espécie na retenção do mercúrio nos sedimentos circundantes. Tal pode dever-se a um aumento da adsorção do metal, a um aumento nos níveis de matéria orgânica ou a um aumento da retenção do metal nas “sediment traps” das suas rizosferas (Caçador et al., 1996; Doyle e Otte, 1997). Isto pode ser o caso das monocotiledóneas, em particular *P. australis*, que apresenta uma maior acumulação de mercúrio no seu rizosedimento.

Segundo um despacho conjunto do Diário da República – II Série Nº 141 de 21/06/1995 sobre a classificação de sedimentos dragados de acordo com o grau de contaminação de metais, os sedimentos são classificados de 1 (menos contaminados) a 5 (extremamente contaminados). De todos os sedimentos analisados, é possível constatar que apenas o rizosedimento de *A. patula* se encontra na classe 4, estando os restantes na classe

5 quanto à contaminação por mercúrio, indicando que estes sedimentos não deverão ser dragados. Logo poder-se-á inferir que, possivelmente, a solução mais atractiva para a descontaminação deste local passará por processos de fitorremediação.

## **4.2 Absorção, acumulação e translocação do mercúrio nas plantas**

A concentração dos metais nos vários órgãos das plantas resulta de processos de absorção e translocação (Singh e McLaughlin, 1999). De acordo com Weis e Weis (2004) o grau de translocação do metal para a parte aérea está dependente da espécie em questão. Tal foi particularmente evidente neste trabalho, uma vez que o padrão de distribuição de Hg variou entre as diferentes espécies. Observando a concentração de mercúrio total nos órgãos das várias plantas, é possível afirmar que de um modo geral, se verificaram diferenças entre dicotiledóneas e monocotiledóneas. *A. patula* e *H. portulacoides* apresentaram, ao longo dos seus órgãos, níveis de mercúrio semelhantes, enquanto que *J. maritimus* e *P. australis* acumularam níveis de mercúrio mais elevados nos órgãos subterrâneos em comparação com os seus órgãos aéreos (Tabela II-3). Estes resultados corroboram outros trabalhos. Otte et al. (1991, 1993) e Fitzgerald et al. (2003) reportaram que as espécies dicotiledóneas tendem a acumular concentrações semelhantes de metais nas raízes e partes aéreas, enquanto que as monocotiledóneas apresentam concentrações de metais superiores nas raízes.

A variabilidade inter-específica dos processos de absorção, acumulação e translocação do Hg nos órgãos e tecidos das plantas, reflectem profundas variações nas respectivas estratégias de eliminação/acumulação do metal. Assim, neste trabalho procedeu-se ao cálculo de vários factores que permitem uma melhor compreensão das estratégias que as diferentes plantas possuem face aos níveis de mercúrio a que estão expostas (Tabela II-4). A razão entre a concentração de mercúrio na raiz e no rizosedimento mostra-nos a capacidade de absorção das plantas. Nenhuma das plantas estudadas exibiu concentrações de mercúrio nas raízes superiores às concentrações de mercúrio no seu rizosedimento. As espécies monocotiledóneas *J. maritimus* e *P. australis* acumularam mais Hg nos órgãos subterrâneos do que as dicotiledóneas *A. patula* e *H. portulacoides*, sendo estes resultados corroborados pelos factores de acumulação. Estas



diferenças de acumulação podem dever-se a diferenças na morfologia e fisiologia dos sistemas radiculares entre as espécies. De acordo com Patra et al. (2004), a afinidade dos sistemas de transporte nas raízes com o Hg pode variar consideravelmente entre espécies. O tamanho e a morfologia do sistema radicular é também uma fonte de variação entre espécies, oxidando a rizosfera a diferentes níveis e variando a disponibilidade dos metais (Ravit et al., 2003). No entanto, existem outros factores que podem explicar estas diferenças. Muitos factores influenciam a absorção de metais pelas plantas, incluindo diferenças na idade e fase do crescimento, variações sazonais, presença de placas de ferro na zona das raízes, nível de contaminação, propriedades do sedimento, inundação tidal e salinidade (Beefink et al., 1982; Caçador et al., 2000; Otte et al., 1993; Rozema et al., 1990; Sundby et al., 1998; Williams et al., 1994b). Há plantas que para evitar a entrada do metal nas raízes excretam compostos que, uma vez na rizosfera, diminuem ou aumentam a disponibilidade do metal para a planta (Meharg, 1994). Os próprios parâmetros físico-químicos dos sedimentos podem influenciar a disponibilidade dos metais. Quanto à libertação de compostos orgânicos pelas raízes destas plantas, não foram efectuadas experiências a esse nível, contudo é uma possibilidade que não deve deixar de ser considerada. No entanto, foi já descrito que algumas plantas de sapal, nomeadamente *J. maritimus*, libertam estes compostos para a rizosfera (Mucha et al., 2008). Assim, as diferenças de acumulação de Hg nos rizosedimentos encontradas neste trabalho parecem dever-se principalmente às próprias espécies e não tanto aos parâmetros físico-químicos.

Uma vez que as concentrações de mercúrio na rizosfera de cada uma das plantas são diferentes, procedeu-se à determinação dos factores de acumulação do metal nas porções aérea e subterrânea face à concentração de mercúrio presente em cada rizosedimento (Tabela II-4). Os factores de acumulação foram muito reduzidos em todas as espécies significando que, independentemente da concentração de metal presente em cada rizosedimento, as plantas acumulam quantidades muito reduzidas de mercúrio. Este facto parece indicar que todas as espécies lidam de modo idêntico com a contaminação de mercúrio, evitando a sua absorção, podendo este comportamento ser a base da tolerância destas plantas face à elevada toxicidade deste metal. Contudo, comparando as várias plantas verificaram-se diferenças, principalmente entre as mono e as dicotiledóneas. O factor de acumulação PA/sed em *A. patula* e *H. portulacoides* foi mais elevado quando comparado com *J. maritimus* e *P. australis*. Na parte subterrânea verificou-se o

comportamento inverso, ou seja, este factor foi mais elevado nas monocotiledóneas. Estas diferenças de acumulação podem dever-se às diferentes estratégias que estes dois grupos possuem para lidar com o metal. Tal como Kiekens (1995), também neste trabalho as monocotiledóneas parecem acumular mais metal nos órgãos subterrâneos em detrimento dos órgãos fotossintéticos, onde o mercúrio pode exercer maiores danos metabólicos. Relativamente às dicotiledóneas, a maior acumulação poderá estar relacionada com um mecanismo eficiente nos órgãos aéreos que impeça o metal de exercer a sua toxicidade, como já referido anteriormente.

Uma vez na raiz, o Hg pode ser retido neste órgão ou ser translocado para outros órgãos tais como rizomas, caules e folhas. Assim, vários factores de translocação foram determinados como medida da restrição do transporte do metal para a parte aérea com o objectivo de comparar o comportamento das diferentes espécies na sua resposta ao mercúrio (Tabela II-4). Uma vez mais, verificou-se uma clara diferença entre os dois grupos de plantas: mono e dicotiledóneas. Neste trabalho, além das raízes, também os rizomas exibiram concentrações elevadas de mercúrio nas duas espécies de monocotiledóneas estudadas, particularmente em *J. maritimus* (Tabela II-3). Outros trabalhos relataram já que *Bolboschoenus maritimus* (Almeida et al., 2006) e *P. australis* (Peeverly et al., 1995) retêm mais metal nos órgãos subterrâneos (em particular no rizoma). Os factores de translocação apresentados pelas monocotiledóneas *J. maritimus* e *P. australis* indicam que o grau de translocação para os órgãos aéreos é bastante reduzido. Estes resultados estão de acordo com outros trabalhos, em que foi demonstrado que, de um modo geral, muitas plantas excluem o mercúrio, retendo-o principalmente na raiz (Patra e Sharma, 2000), actuando este órgão como uma barreira de modo a evitar a passagem do metal para as partes aéreas da planta. Por outro lado, os resultados demonstraram que as espécies dicotiledóneas, em particular *H. portulacoides*, apresentaram os valores de Hg mais elevados nas folhas quando comparada especialmente com as espécies monocotiledóneas (Tabela II-3). Analisando a razão entre a concentração de mercúrio nas folhas e na raiz e entre a PA e a PS das plantas, observa-se que nas dicotiledóneas, o factor de translocação foi muito mais elevado do que nas monocotiledóneas. Aparentemente, *A. patula* e *H. portulacoides* parecem possuir estratégias diferentes de acumulação de mercúrio quando comparadas com as monocotiledóneas. De acordo com estes resultados, duas justificações principais podem ser consideradas. As espécies pertencentes à família

Chenopodiaceae apresentam adaptações fisiológicas à salinidade, denominadas de tricomas localizadas nas folhas que lhes permitem tolerar o excesso de sal. No entanto, foi já demonstrado que além de acumularem sal, estas estruturas podem também acumular metais (Hagemeyer e Waisel, 1988; MacFarlane e Burchett, 2000; Neumann et al., 1995). Uma vez que *A. patula* e *H. portulacoides* pertencem a esta família e ambas possuem estas adaptações, os valores de mercúrio encontrados poderão ser resultado de processos de translocação do mercúrio da raiz para a parte aérea, ficando acumulado nestas estruturas. Outra hipótese para esta elevada concentração de mercúrio centra-se na capacidade que algumas plantas possuem em absorver mercúrio da atmosfera através dos estomas (Marschner, 1995; Martin e Juniper, 1970). A absorção de Hg pelas plantas não pode somente ser relacionada com as concentrações de metal no sedimento, uma vez que em ambientes muito contaminados pode ocorrer uma troca de Hg entre a atmosfera e a vegetação (Lodenius et al., 2003). A capacidade que as plantas possuem em absorver Hg atmosférico a partir das folhas está bem documentada (Goren e Siegel, 1976; Hitchcock e Zimmermann, 1957; Waldron e Terry, 1975), podendo ser também esta a razão subjacente ao maior conteúdo de Hg nas folhas face aos órgãos subterrâneos, em algumas espécies (Wang et al., 1998).

A enorme complexidade de graus de tolerância face à toxicidade por metais pesados é indicativa da diversidade de estratégias de protecção por estas desenvolvidas. Assim, os resultados obtidos sugerem que a tolerância a mercúrio nas espécies *J. maritimus* e *P. australis* pode estar associada a um aumento na acumulação do metal na raiz e consequente restrição do metal para os órgãos aéreos, ao contrário de *A. patula* e *H. portulacoides* que acumulam uniformemente o mercúrio pelos seus órgãos. Estas diferenças na distribuição do mercúrio nas plantas podem reflectir diferentes estratégias usadas pelas mesmas para lidar com o stresse imposto por este metal.

### **4.3 Fraccionamento celular do mercúrio**

A maioria dos trabalhos relativos à toxicidade do Hg nas plantas baseia-se na concentração total do metal em detrimento da acumulação nas fracções intracelulares (Boening, 2000), onde a toxicidade do Hg ocorre. Muitas plantas imobilizam os metais nas paredes celulares (Patra et al., 2004), evitando assim os efeitos nocivos que o metal livre

pode exercer na célula. Assim, neste trabalho, não foi somente analisada a distribuição do metal entre os diferentes órgãos mas também a sua partição entre as fracções solúvel e insolúvel.

É importante definir correctamente os termos “Hg na fracção insolúvel” e “Hg na fracção solúvel”. De acordo com Rauser (2000), no final da extracção sequencial realizada neste trabalho são obtidas duas fracções e em cada uma delas o Hg foi quantificado. Assim, o Hg quantificado na fracção insolúvel corresponde ao mercúrio fortemente ligado às paredes celulares e às membranas dos organelos celulares. O Hg quantificado na fracção solúvel corresponde ao metal que se encontra em solução ou ligado a péptidos, ácidos orgânicos ou outras moléculas orgânicas. Assim, é notório que nas quatro plantas estudadas, mais de 85% do mercúrio encontra-se ligado à fracção insolúvel (Figura II-4). Tal como noutros estudos (MacFarlane e Burchett, 2000; Vesik et al., 1999; Wang e Greger, 2004; Weis e Weis, 2004), os resultados obtidos neste trabalho demonstram que em todas as plantas a maioria do metal está ligado a estruturas celulares e membranas, funcionando como uma barreira de protecção, reduzindo a concentração de metal no citosol (Ramos et al., 2002; Zornoza et al., 2002). Esta acumulação preferencial de metal na fracção insolúvel parece representar um mecanismo de protecção ao mercúrio em plantas que habitam ambientes contaminados. Estes resultados são corroborados pela análise do factor de partição nas várias espécies que é dado pela razão entre a concentração de mercúrio nas fracções solúvel e insolúvel nos vários órgãos das plantas (Tabela II-5). Em todas as plantas verifica-se que este factor é sempre muito inferior a um, sugerindo um esforço por parte das plantas em manter o Hg na fracção insolúvel, restringindo o aumento do metal no citosol e consequentemente a sua toxicidade. No entanto, relativamente ao mercúrio solúvel, é possível constatar que existem diferenças importantes entre as diferentes espécies. As dicotiledóneas apresentam maior percentagem de Hg nesta fracção (corroborados pelo factor de partição) comparativamente às espécies monocotiledóneas, sugerindo diferentes estratégias de tolerância ao metal entre mono e dicotiledóneas. Assim sendo, e tomando em consideração que o Hg citosólico é mais tóxico, estes resultados indicam que as dicotiledóneas poderão possuir outros mecanismos que lhes permitam tolerar o Hg no citosol comparativamente às espécies monocotiledóneas. Nos capítulos seguintes serão abordados alguns destes mecanismos e consequentemente relacionados com a capacidade de tolerância das plantas ao mercúrio.

#### 4.4 Potencial para fitorremediação de mercúrio e o seu significado ecológico

Com o intuito de verificar se alguma das espécies usadas neste estudo tem capacidade de extrair mercúrio dos sedimentos, foi determinada a biomassa aérea de cada uma das plantas por unidade de área ( $\text{m}^2$ ) e calculadas as quantidades de mercúrio que cada planta acumula (Tabela II-6). Assim, *H. portulacoides*, *J. maritimus* e *P. australis* apresentaram valores semelhantes de mercúrio por unidade de área, sendo *A. patula* a planta que menos mercúrio acumulou na sua parte aérea ( $28,6 \mu\text{g Hg m}^{-2}$ ). No entanto, e apesar de não ser conhecida a quantidade de mercúrio na parte subterrânea por unidade de área, a partir dos resultados obtidos neste trabalho, foi observado que *J. maritimus* e *P. australis* apresentam valores elevados de mercúrio nos seus órgãos subterrâneos. Exposto isto, a eventual utilização destas plantas para fitorremediação de mercúrio em zonas de sapal pode ser perspectivada sob duas formas distintas: fitoestabilização do metal nas raízes e respectivos rizosedimentos ou fitoextração do metal por acumulação na parte aérea e consequente remoção (Mukherjee, 2001). Em termos de fitoextração *H. portulacoides*, *J. maritimus* e *P. australis* parecem ser as plantas mais apropriadas, enquanto que para propósitos de fitoestabilização, *J. maritimus* e *P. australis* parecem apresentar capacidades semelhantes. No entanto, para poder concluir com mais precisão sobre o potencial de fitorremediação destas espécies, seria necessário efectuar um estudo que tomasse em consideração as variações sazonais na biomassa das plantas e nas concentrações de mercúrio, pois dariam informação adicional sobre a capacidade de acumulação de mercúrio ao longo do ano das várias plantas e consequentemente sobre a sua capacidade de fitoextração e/ou fitoestabilização.

O padrão de distribuição do metal pelos órgãos das plantas pode originar importantes consequências ambientais. A estabilização do Hg ocorre nas espécies que o retém em maior quantidade nos seus órgãos subterrâneos e rizosedimentos, contribuindo assim para uma menor disponibilidade do metal para o ecossistema (Doyle e Otte, 1997; Weis e Weis, 2004). As monocotiledóneas ao apresentarem uma elevada biomassa subterrânea (Almeida et al., 2006), poderão permitir uma maior retenção de Hg nos órgãos subterrâneos bem como nos rizosedimentos (Figura II-2 e Tabela II-3), retendo assim o Hg numa área específica do sapal. É de salientar também que o facto de os órgãos subterrâneos

das monocotiledóneas reterem mais Hg na fracção insolúvel, torna o metal menos disponível para ser translocado para a parte aérea. Por outro lado, o metal acumulado nas porções aéreas pode ser libertado (Weis et al., 2002) ou acumulado nos detritos vegetais (Windham et al., 2003), regressando ao sistema e funcionando como uma potencial fonte de contaminação de metais (Weis e Weis, 2004). Tal é o caso de *A. patula* e *H. portulacoides*. No entanto, os pools de Hg na parte aérea trouxeram também nova informação sobre a mobilidade do Hg no ecossistema. Embora as dicotiledóneas apresentem uma maior taxa de translocação de Hg para os órgãos aéreos, são *H. portulacoides*, *J. maritimus* e *P. australis* que acumulam níveis mais elevados de Hg nos órgãos aéreos por unidade de área. Assim, estas espécies além de apresentarem capacidades semelhantes de fitoextração, poderão igualmente representar uma potencial fonte de Hg no sistema de sapal.

# **Capítulo III**

---

## **O stresse oxidativo como resposta ao stresse metálico**

---

---

### **1. Introdução**

O stresse oxidativo é um factor central em processos de stresse biótico e abiótico que ocorre quando há um desequilíbrio em qualquer compartimento celular entre a produção de espécies reactivas de oxigénio (ROS, do inglês “reactive oxygen species”) e as defesas antioxidantes, conduzindo a alterações fisiológicas (Foyer e Noctor, 2003). Os ROS são considerados como moléculas nocivas. Assim, é importante que as células controlem exaustivamente a concentração destas espécies (Schützendübel e Polle, 2002).

#### **1.1 Espécies reactivas de oxigénio e danos oxidativos**

Nas plantas, os ROS são produzidos continuamente como sub-produtos de várias vias metabólicas (fotossíntese e respiração) localizadas em diferentes compartimentos celulares, nomeadamente cloroplastos, mitocôndrias e peroxissomas (Asada et al., 1987; Foyer et al., 1990). A formação dos vários ROS ocorre principalmente através da redução do oxigénio molecular ( $O_2$ ) a água ( $H_2O$ ), em diferentes etapas (Hippeli et al., 1999). A primeira espécie produzida é o radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) que apresenta um tempo de vida reduzido. A segunda redução do  $O_2$  a  $H_2O$  gera peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ), uma molécula com um tempo de vida relativamente longo e que se pode difundir a partir do seu

local de produção (Levine et al., 1994; Willekens et al., 1997). Finalmente, a última espécie gerada por esta série de reduções é o radical hidroxilo ( $\text{OH}^\cdot$ ), apresentando um potencial oxidante muito forte e um tempo de vida extremamente curto (Foyer et al., 1994).

Alguns metais, nomeadamente o mercúrio, podem promover a formação directa ou indirecta de ROS através de: (1) transferência directa de electrões, envolvendo catiões metálicos (2) interferência nas vias metabólicas em especial na cadeia transportadora de electrões e fase I da fotossíntese, (3) inactivação e diminuição da expressão das enzimas antioxidantes, (4) depleção de antioxidantes de baixo peso molecular (Cho e Park, 2000; Elstner, 1990; Halliwell e Gutteridge, 1984; Zhou et al., 2008). Por estas razões, a formação excessiva de ROS pode originar danos oxidativos em várias macromoléculas, nomeadamente ácidos gordos, ácidos nucleicos e proteínas (Cho e Park 2000; Gallego et al., 2002; Thompson et al., 1987), como demonstrado na Figura III-1.

Os ROS actuam principalmente nos lípidos membranares, particularmente nos ácidos gordos polinsaturados. Os ácidos gordos peroxidados são instáveis e são decompostos através de reacções secundárias, originando nomeadamente aldeídos (malondialdeído – MDA) (Elstner, 1990). A oxidação das proteínas é definida como uma modificação covalente em proteínas induzida por ROS ou por subprodutos do stresse oxidativo, sendo esta modificação normalmente irreversível (Ghezzi e Bonetto, 2003). A oxidação de lípidos e proteínas é frequentemente usada como marcador de diagnóstico de stresse oxidativo. Existem alguns estudos na literatura referentes à indução de danos oxidativos mediada por mercúrio (Cargnelutti et al., 2006; Cho e Park, 2000; Ferrat et al., 2002; Moreno-Jiménez et al., 2006; Rellán-Álvarez et al., 2006; Zhou et al., 2007; Zhou et al., 2008), podendo também originar um défice em  $\text{K}^+$  e uma alteração na actividade de enzimas antioxidantes (Ali et al., 2000; Cargnelutti et al., 2006; Cho e Park 2000; Israr e Sahi, 2006; Moreno et al., 2008; Ortega-Villasante et al., 2005; Zhang et al. 2007; Zhou et al., 2007).



## **1.2 O Sistema de defesa antioxidante**

Embora o nível basal de ROS possa ser usado pelas plantas com o intuito de monitorizar os seus níveis intracelulares de stresse, este nível tem que ser mantido sob um rigoroso controlo uma vez que a sobre-acumulação de ROS pode resultar, em última instância, na morte celular (Asada et al., 1987; Asada et al., 1999; Dat et al., 2000; Hammond-Kosack et al., 1996). De modo a minimizar o aumento de ROS induzido por metais e consequentemente minimizar a ocorrência de danos oxidativos, as plantas possuem vários sistemas de defesa antioxidante enzimática e não enzimática (Apel e Hirt 2004; Foyer e Noctor, 2003). Estes sistemas de defesa antioxidante constituem a mais importante linha de defesa contra os efeitos nocivos dos ROS (Medici et al., 2004).

### **1.2.1 Mecanismos não enzimáticos de desintoxicação de ROS**

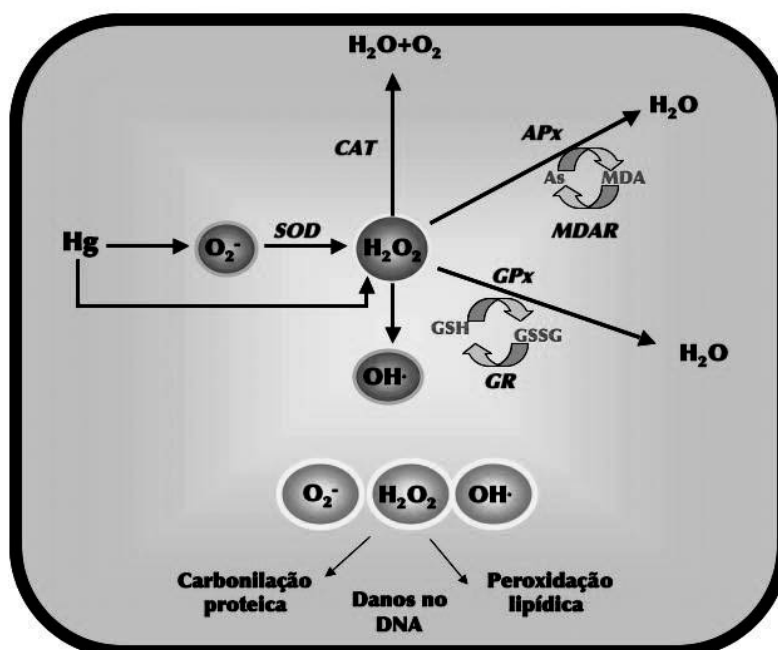
Os antioxidantes não enzimáticos existentes nas plantas incluem o ascorbato (AS) e a glutathiona (GSH), bem como o tocoferol, flavonoides, alcalóides e carotenóides (Apel e Hirt, 2004; Gratão et al., 2005). Estes compostos desempenham funções antioxidantes importantes, actuando quer isoladamente quer como substrato em reacções enzimáticas de desintoxicação (Chaudiere e Ferrari-Iliou, 1999; Foyer, 1993; Hausladen e Alscher, 1994; Hess, 1993; Winkler et al., 1994). A GSH é um dos mais eficientes metabolitos antioxidantes, desempenhando funções fisiológicas importantes, nomeadamente ao nível da regulação redox, da conjugação de metabolitos, da desintoxicação de xenobióticos, da homeostase celular e da sinalização celular, induzindo respostas adaptativas (Noctor et al., 2002). Na presença de stresse oxidativo, a GSH reage quimicamente com os ROS, actuando directamente como agente antioxidante (Israr e Sahi, 2006). Sob condições extremas de stresse, a concentração intracelular de glutathiona oxidada (GSSG) aumenta concomitantemente com o decréscimo de GSH (Strid, 1993). Uma taxa elevada de GSH/GSSG é fundamental à manutenção da glutathiona como agente antioxidante (Foyer et al., 1997), uma vez que o seu decréscimo poderá comprometer o estado redox da célula.

O ascorbato é igualmente um dos mais importantes metabolitos antioxidantes (Noctor e Foyer, 1998; Smirnoff, 2000). Em condições fisiológicas normais, o AS existe sob a forma reduzida maioritariamente nos cloroplastos. Além de actuar como co-substrato no ciclo da GSH-AS, o AS funciona igualmente como antioxidante, eliminando

directamente os ROS ( $O_2^{\bullet-}$  e  $OH^{\bullet}$ ) e reduzindo o  $H_2O_2$  através da enzima ascorbato peroxidase (Noctor e Foyer, 1998).

Enquanto que a GSH é oxidada pelos ROS, originando GSSG, o AS é oxidado a monodihidroascorbato (MDA) e a dihidroascorbato (DHA). Através do ciclo do ascorbato-glutationa, GSSG, MDA e DHA são reduzidos, originando novamente GSH e AS. Uma elevada taxa de GSH:GSSG e de ascorbato reduzido:oxidado é fundamental para a eliminação de ROS nas células. Os estados reduzidos destes antioxidantes são mantidos pela glutathiona reductase (GR), monodihidroascorbato reuctase (MDAR), e dihidroascorbato reductase (DHAR), usando NADPH como poder redutor (Asada e Takahashi, 1987; Tsugane et al., 1999).

### 1.2.2 Mecanismos enzimáticos de desintoxicação de ROS



**Figura III-1:** Stresse Oxidativo e Sistema Enzimático de Defesa Antioxidante. As espécies reactivas de oxigénio (ROS) são formadas na presença de Hg. A eliminação do radical  $O_2^{\bullet-}$  e do  $H_2O_2$  é efectuada pela acção de várias enzimas antioxidantes: superóxido dismutase (SOD); catalase (CAT); ascorbato peroxidase (APX) e glutathiona peroxidase (GPX). O radical  $O_2^{\bullet-}$  é convertido em  $H_2O_2$  por acção da SOD, que consequentemente é eliminado pela CAT, APX e GPX. A eliminação do  $H_2O_2$  através da APX ocorre através da oxidação do ascorbato (AS) a monodihidroascorbato (MDA) por acção da enzima monodihidroascorbato reductase (MDAR). A GPX elimina o  $H_2O_2$  usando glutathiona (GSH) como agente redutor através da enzima glutathiona reductase (GR). A ineficácia do sistema antioxidante promove um aumento de ROS, originando vários danos oxidativos, nomeadamente: peroxidação lipídica, danos no DNA e oxidação proteica.

A eliminação de ROS nas células requer a acção de várias enzimas antioxidantes. Desta forma, os principais mecanismos enzimáticos de desintoxicação de ROS constituem uma importante linha de defesa antioxidante (Moller, 2001). Estas defesas são levadas a cabo por enzimas que interrompem as cascatas de oxidação em diferentes fases (Noctor e Foyer, 1998). Destas fazem parte integrante a superóxido dismutase (SOD) (dismutando o radical superóxido em  $\text{H}_2\text{O}_2$ ), a glutathione peroxidase (GPX), a catalase (CAT) e a ascorbato peroxidase (APX) (transformando subsequentemente o  $\text{H}_2\text{O}_2$  em  $\text{H}_2\text{O}$ ) (Gratão et al., 2005; Noctor e Foyer, 1998) (Figura III-1).

O radical  $\text{O}_2^{\bullet-}$  produzido nos diferentes compartimentos celulares é rapidamente convertido em  $\text{H}_2\text{O}_2$  por acção da SOD (Bowler et al., 1992), actuando como primeira linha de defesa contra os ROS (Alscher et al., 2002). Contudo, o  $\text{H}_2\text{O}_2$  produzido é também tóxico, devendo ser eliminado em reacções subsequentes. Em plantas, existem várias enzimas responsáveis pela eliminação do  $\text{H}_2\text{O}_2$ , sendo as mais importantes a CAT, a APX e a GPX (Noctor e Foyer, 1998). A CAT é uma enzima antioxidante que remove o excesso de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , convertendo-o em  $\text{O}_2$  e  $\text{H}_2\text{O}$ , protegendo as células contra danos oxidativos (Mika et al., 2004). A eliminação de  $\text{H}_2\text{O}_2$  pela APX ocorre através da oxidação do AS a MDA, o qual pode ser regenerado pela MDA redutase (MDAR) usando NAD(P)H como agente redutor. O MDA, por sua vez, pode oxidar-se espontaneamente, dando origem a DHA, sendo a sua regeneração mediada pela enzima dihidroascorbato redutase (DHAR) através da oxidação de GSH a GSSG. Por último, a enzima glutathione redutase (GR) reduz a GSSG a GSH usando NAD(P)H como agente redutor. Tal como a APX, também a enzima GPX elimina o  $\text{H}_2\text{O}_2$ , usando, contudo, a GSH directamente como agente redutor. O ciclo da GPX é encerrado através da regeneração da GSH a partir da GSSG, por acção da GR (Apel e Hirt, 2004).

O stresse oxidativo é uma consequência importante resultante da exposição a metais. Assim, a expressão genética, os níveis proteicos e a actividade das enzimas antioxidantes respondem à exposição a estes metais. Dependendo do metal, das concentrações utilizadas e da duração da exposição, os metais podem exercer efeitos opostos no sistema antioxidante, nomeadamente aumentos e/ou diminuições dos vários agentes antioxidantes (Gratão et al., 2005; Schützendübel e Polle, 2002). Vários autores revelaram que o Hg provoca aumentos em várias enzimas antioxidantes, nomeadamente ao nível da SOD, POD, APX e CAT (Cho e Park, 2000; Ferrat et al., 2002; Zhou et al., 2007).

Contudo, e considerando a mesma espécie vegetal, existem relatos de aumentos e subsequentes decréscimos na actividade de algumas enzimas antioxidantes (CAT, SOD, APX, GR) dependendo da intensidade e da duração da exposição ao Hg (Cargnelutti et al., 2006; Israr et al., 2006).

Na maioria das situações, os sintomas de stresse oxidativo surgem quando a exposição ao metal é muito prolongada, originando intensos danos oxidativos que resultam numa falha geral do metabolismo celular.

### **1.3 Objectivos**

Locais contaminados por metais são, por si só, excelentes candidatos para analisar a maquinaria antioxidante responsável pelas adaptações fisiológicas das espécies vegetais que habitam estes ecossistemas. As plantas que colonizam ambientes contaminados por mercúrio podem desenvolver vários mecanismos antioxidantes para lidar com a toxicidade exercida por este metal.

Existe uma extensa informação sobre a toxicidade provocada por metais em várias espécies vegetais. Contudo, os mecanismos associados ao stresse oxidativo induzido por Hg bem como a resposta das defesas antioxidantes em plantas estão ainda por compreender. A análise dos parâmetros associados ao stresse oxidativo também podem ser utilizados como ferramenta para aceder ao nível de stresse que as espécies estão a experienciar, permitindo perceber quais os efeitos que o Hg produz nas diferentes plantas. Considerando que a maioria dos trabalhos experimentais é realizada em laboratório, com exposições muito elevadas, de curta duração e em plantas jovens, torna-se fundamental uma melhor compreensão sobre a produção de stresse oxidativo associada a Hg e a subsequente resposta antioxidante em plantas adultas que colonizam ambientes sujeitos a uma exposição elevada e prolongada. Neste contexto, o objectivo deste capítulo foi averiguar se o mercúrio induz stresse oxidativo nas diferentes plantas e quais os mecanismos de resposta antioxidante ao stresse imposto.

Procurou-se então:

- Analisar os níveis de espécies reactivas de oxigénio através da quantificação do radical superóxido;

- Averiguar a presença de eventuais danos celulares oxidativos provocados pela presença do metal, nomeadamente ao nível dos lípidos e ao nível das proteínas;
- Quantificar a actividade de várias enzimas antioxidantes;
- Relacionar os diferentes níveis de stresse oxidativo que as plantas experienciam com os diferentes níveis de acumulação de mercúrio nos vários órgãos;

## 2. Material e Métodos

### 2.1 Determinação de ROS

#### 2.1.1 Conteúdo em radical superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ )

**Preparação dos extractos celulares:** as amostras congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$  dos órgãos vegetais das várias plantas usadas neste estudo foram homogeneizadas em azoto líquido num almofariz com tampão de homogeneização (50 mM fosfato de potássio pH 7,8; 0,1 mM EDTA; 0,3% Triton X-100 (v/v) e 4% PVP (w/v)) numa razão de 1 g de material vegetal para 2 ml de tampão de homogeneização. O material extraído foi centrifugado a 15000 g durante 20 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . O sobrenadante foi recolhido e congelado a  $-80^{\circ}\text{C}$  para posterior análise.

**Determinação do conteúdo em  $O_2^{\bullet-}$ :** A quantificação do conteúdo em  $O_2^{\bullet-}$  foi determinada de acordo com o método de Ke et al. (2002) com algumas alterações; num volume de reacção de 700  $\mu\text{l}$ , juntaram-se 200  $\mu\text{l}$  de cloreto de hidroxilamónio a 1 mM e 100  $\mu\text{l}$  de extracto celular que foram incubados a  $25^{\circ}\text{C}$  durante 1 hora. A cor foi desenvolvida pela adição de 200  $\mu\text{l}$  de ácido sulfanílico a 17 mM e de 200  $\mu\text{l}$  de  $\alpha$ -naftilamina a 7 mM. As amostras foram incubadas a  $25^{\circ}\text{C}$  durante 20 minutos. A absorção específica foi determinada a 530 nm. O nitrito de sódio foi usado como solução padrão para calcular o conteúdo em  $O_2^{\bullet-}$ .

### 2.2 Determinação de danos celulares

#### 2.2.1 Peroxidação Lípidica

**Preparação dos extractos celulares:** as amostras congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$  foram homogeneizadas em azoto líquido num almofariz com TCA numa razão de 1 g de material vegetal para 3 ml de TCA a 0,5% (w/v). O material extraído foi centrifugado a 10000 g

durante 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi recolhido e congelado a -80°C para posterior análise.

**Determinação do grau de peroxidação lipídica:** O grau de peroxidação lipídica foi determinado de acordo com o método de Ohkawa et al. (1979). Num volume de reacção de 600 µl, 300 µl de amostra foram adicionados a 300 µl de TBA a 0,5% (w/v) em TCA a 20% (w/v) e incubados a 96°C durante 25 minutos. Os tubos foram colocados no gelo durante 5 minutos e centrifugados a 8000 g durante 5 minutos à temperatura ambiente. A absorvância foi determinada a 532 nm e corrigida para a turbidez não específica, subtraindo a absorvância a 600 nm. A concentração de péroxidos lipídicos foi expressa em termos de MDA (malondialdeído) por µmol g<sup>-1</sup> de peso fresco, usando o coeficiente de extinção molar de 155 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>.

### 2.2.2 Carbonilação Proteica

**Preparação dos extractos celulares:** as amostras congeladas a -80°C foram homogeneizadas em azoto líquido num almofariz com tampão de extração (10 mM Fosfato de sódio pH 7,4; 1 mM EDTA; 2 mM DTT; 0,2% Triton X-100 (v/v) e 1 mM PMSF) numa razão de 1 g de material vegetal para 4 ml de tampão de homogeneização. O material extraído foi centrifugado a 12000 g durante 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi recolhido e congelado a -80°C para posterior análise.

**Determinação do grau de carbonilação proteica:** O grau de proteínas carboniladas foi determinado de acordo com o protocolo de Levine et al. (1994). Num volume de reacção de 1 ml, 800 µl de amostra foram incubados com 200 µl de Triton X-100 a 0,15% (v/v) e sulfato de estreptomicina a 5% (w/v) durante 20 minutos de modo a remover os ácidos nucleicos. Após centrifugação a 2000 g durante 10 minutos, os sobrenadantes (250 µl) foram misturados com 300 µl de DNPH a 10 mM em HCl a 2 M. Os brancos foram incubados com 300 µl HCl a 2 M. Após 1 hora de incubação no escuro à temperatura ambiente, as proteínas foram precipitadas com TCA a 10% (w/v) e os resíduos foram lavados três vezes com 500 µl de etanol:acetato de etilo (1:1). Os resíduos foram dissolvidos em hidrocloreto de guanidina a 6 M em 20 mM tampão fosfato de potássio (pH

2,3) e a absorvância medida a 370 nm. Os grupos carbonilo foram calculados usando o coeficiente de absorção molar de  $22\,000\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$  para as hidrazonas alifáticas.

## **2.3 Determinação da actividade de enzimas antioxidantes**

### **2.3.1 Superóxido dismutase**

**Preparação dos extractos enzimáticos:** as amostras congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$  foram homogeneizadas em azoto líquido num almofariz com tampão de extração (100 mM Tris-HCl pH 8,0; 0,1 mM EDTA; 1% PVP (w/v) e 0,5% Triton X-100 (v/v)) numa razão de 1g de material vegetal para 2 ml de tampão de homogeneização. O material extraído foi centrifugado a 10000 g durante 15 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . O sobrenadante foi recolhido e congelado a  $-80^{\circ}\text{C}$  para posterior análise.

**Determinação da actividade da SOD:** a actividade da SOD foi determinada pelo método químico do NBT (nitroazul de tetrazólio). O ensaio foi baseado na capacidade da SOD inibir a redução do NBT (Beauchamp e Fridovich, 1971). A mistura de reacção continha 25  $\mu\text{l}$  de amostra, 525  $\mu\text{l}$  de sal de tetrazólio a 57  $\mu\text{M}$  e 50  $\mu\text{l}$  de xantina oxidase a 56,1 mU/ml. As amostras foram incubadas 20 minutos à temperatura ambiente com agitação de 300 rpm. A fotoredução do NBT foi medida a 560 nm e a actividade da SOD foi determinada usando padrões conhecidos de SOD (Sigma). Uma unidade de SOD foi definida como a quantidade de enzima necessária para catalizar a dismutação de 50% dos radicais de superóxido. A actividade da enzima foi expressa em U de SOD por mg de proteína.

### **2.3.2 Catalase**

**Preparação dos extractos enzimáticos:** as amostras congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$  foram homogeneizadas em azoto líquido num almofariz com tampão de homogeneização (50 mM fosfato de potássio pH 7,0; 1 mM EDTA; 1% PVP (w/v); 1% Triton X-100 (v/v) e 1 mM DTT) numa razão de 1 g de material vegetal para 5 ml de tampão de homogeneização. O



material extraído foi centrifugado a 10000 g durante 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi recolhido e congelado a -80°C para posterior análise.

**Determinação da actividade da catalase:** a actividade da catalase foi determinada de acordo com Johansson e Borg (1988). O método é baseado na acção da enzima sobre o metanol na presença de uma concentração óptima de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Para tal, preparou-se uma mistura com 250 µl de tampão fosfato de potássio 100 mM pH 7,0; 75 µl de metanol e 50 µl de amostra. A reacção foi iniciada com a adição de 50 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 35,28 mM e a mistura foi incubada à temperatura ambiente durante 20 minutos. Após esse período adicionou-se 75 µl de KOH a 10 M para terminar a reacção, e posteriormente 75 µl de purpald (34,2 mM). A mistura foi uma vez mais incubada nas condições anteriores durante 10 minutos, após o qual foi acrescentado 25 µl de periodato de potássio a 65,2 mM. O preparado foi novamente incubado nas mesmas condições durante 5 minutos. A actividade da catalase foi determinada espectrofotometricamente a 540 nm usando 4-amino-3-hidrazino-5-mercaptop-1,2,4-triazole (Purpald) como cromogénio. A actividade da enzima foi expressa em µmol de formaldeído formado por mg de proteína.

### 2.3.3 Glutathione peroxidase

**Preparação dos extractos enzimáticos:** as amostras congeladas a -80°C foram homogeneizadas em azoto líquido num almofariz com tampão de homogeneização (50 mM Tris-HCl pH 7,5; 5 mM EDTA e 1 mM DTT) numa razão de 1 g de material vegetal para 3 ml de tampão de homogeneização. O material extraído foi centrifugado a 10000 g durante 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi recolhido e congelado a -80°C para posterior análise.

**Determinação da actividade da GPx:** a actividade da GPx foi determinada através de um ensaio indirecto (Paglia e Valentine, 1987); na primeira reacção a GPx reduz o hidroperóxido de cumeno através da oxidação da GSH com formação de GSSG, na segunda reacção a GSSG é novamente reduzida a GSH pela GR com consumo de NADPH. À mistura de reacção contendo 60 µl de amostra, 309 µl de 50 mM de tampão Tris-HCl pH 7,6; 5 mM de EDTA, 60 µl de hidroperóxido de cumeno a 2 mM, 120 µl de GSH a 5 mM e 6 µl de GR a 25U/ml, adicionou-se 45 µl de NADPH a 2 mM para dar início à reacção. A

mistura foi cuidadosamente agitada durante alguns segundos e o decréscimo de absorvância a 340 nm foi acompanhado durante 3 minutos. A actividade da enzima foi determinada usando o coeficiente de extinção molar de  $0,00622 \mu\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$  para o NADPH e a actividade da enzima foi expressa em unidades por mg proteína.

## **2.4 Quantificação da proteína**

O conteúdo em proteínas solúveis foi determinado de acordo com o método de Bradford (1976) usando albumina do soro bovino (BSA) como padrão. O ensaio é baseado na formação do complexo albumina-corante, detectado espectrofotometricamente a 595 nm.

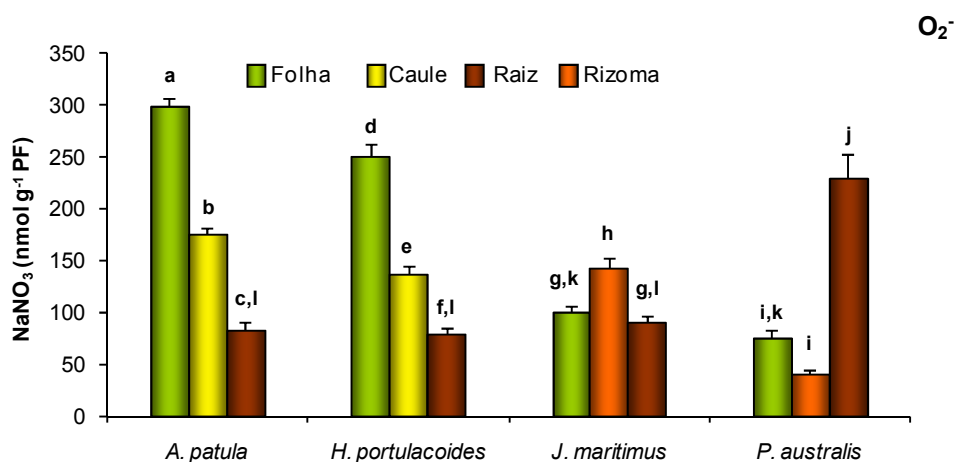
## **2.5 Tratamento estatístico**

Para o radical  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , peroxidação lipídica e oxidação proteica realizou-se uma ANOVA bifactorial e para a determinação das enzimas antioxidantes realizou-se uma ANOVA unifactorial para valores de significância de  $P < 0,05$  utilizando o programa SigmaStat versão 3.5.

## 3. Resultados

### 3.1 Espécies Reactivas de Oxigénio

Neste capítulo foi determinado o conteúdo em espécies reativas de oxigénio (ROS) nos órgãos das várias espécies vegetais, nomeadamente o radical superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ). Os valores relativos a este parâmetro encontram-se expressos na Figura III-2.

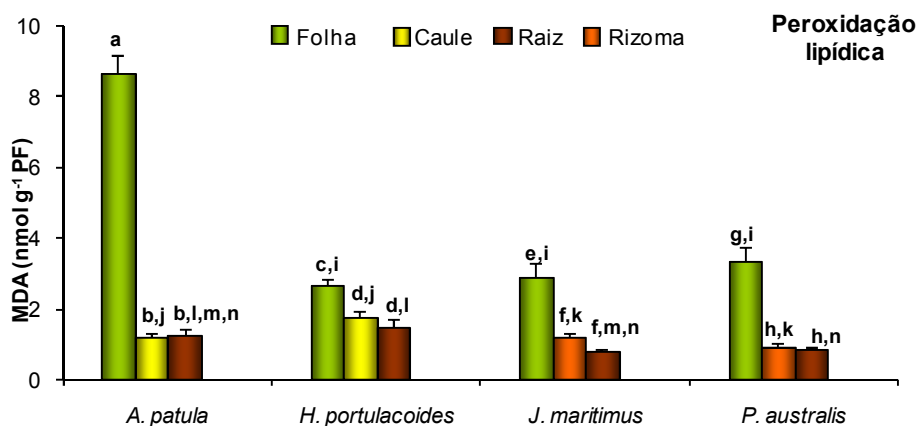


**Figura III-2:** Níveis do radical superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) (nmol  $NaNO_3$  g<sup>-1</sup> peso fresco) nos diferentes órgãos de *A. patula*, *H. portulacoides*, *J. maritimus* e *P. australis* colhidas no Esteiro de Estarreja. Os valores são médias  $\pm$  erro padrão de 3 a 6 réplicas. Letras iguais significa que não existem diferenças significativas entre os vários órgãos ( $P > 0,05$ ).

Observaram-se diferenças nas concentrações do radical  $O_2^{\bullet-}$  entre os órgãos das diferentes espécies estudadas. As dicotiledóneas *A. patula* e *H. portulacoides* apresentaram diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) nos valores de  $O_2^{\bullet-}$  entre os diferentes órgãos, sendo os valores mais elevados encontrados nas folhas. No entanto, nas monocotiledóneas *J. maritimus* e *P. australis* esta tendência não foi verificada. *J. maritimus* evidenciou valores significativamente superiores ( $P < 0,05$ ) deste radical no rizoma, enquanto que *P. australis* apresentou níveis significativamente mais elevados de  $O_2^{\bullet-}$  na raiz ( $P < 0,05$ ).

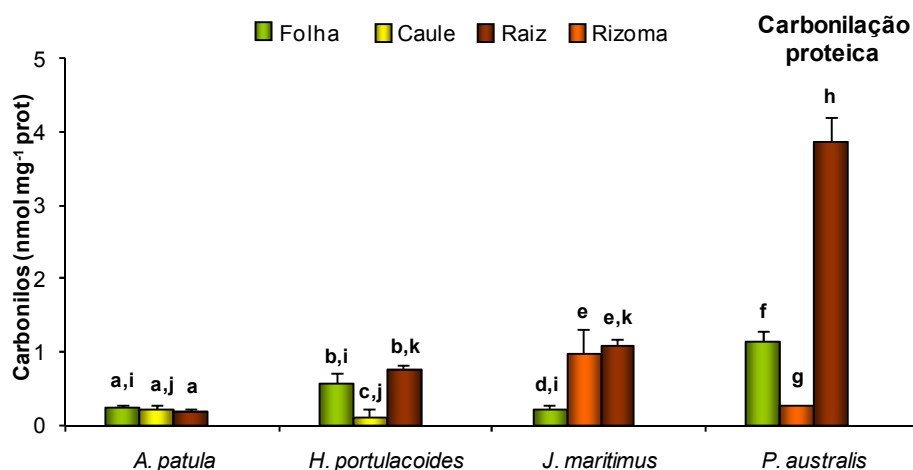
### 3.2 Danos Celulares

Tendo sido verificada a formação de espécies reactivas de oxigénio (radical  $O_2^{\bullet-}$ ) nas várias espécies vegetais, averiguou-se a presença de eventuais danos oxidativos celulares, nomeadamente em lípidos e proteínas, alvos preferenciais das espécies reactivas de oxigénio.



**Figura III-3:** Peroxidação lipídica (nmol MDA  $g^{-1}$  peso fresco) nos diferentes órgãos de *A. patula*, *H. portulacoides*, *J. maritimus* e *P. australis* colhidas no Esteiro de Estarreja. Os valores são médias  $\pm$  erro padrão de 3 a 6 réplicas. Letras iguais significa que não existem diferenças significativas entre os vários órgãos ( $P > 0,05$ ).

Observando a Figura III-3 verificou-se que todas as espécies estudadas apresentaram um padrão semelhante de peroxidação lipídica, ainda que os valores entre elas tenham sido diferentes. Em todas as plantas, o órgão vegetal com maiores níveis de lípidos oxidados foram as folhas, sendo *A. patula* a espécie que exibiu o valor mais elevado (8,65 nmol MDA  $g^{-1}$  peso fresco). Em cada uma das plantas, os níveis de peroxidação dos restantes órgãos são significativamente inferiores aos das folhas ( $P < 0,05$ ), não apresentando diferenças significativas entre si ( $P > 0,05$ ).

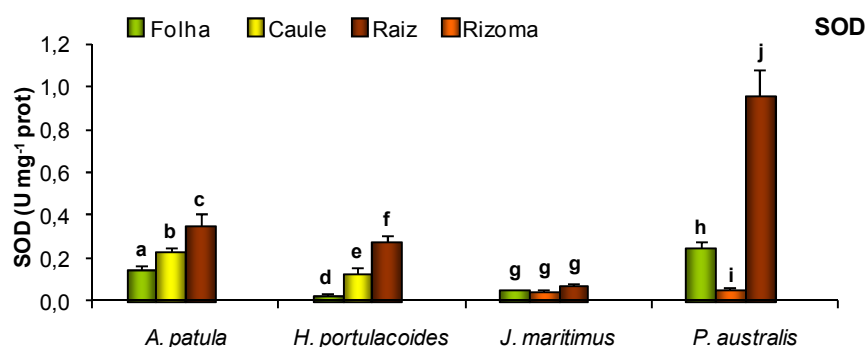


**Figura III-4:** Carbonilação proteica (nmol grupos carbonilo  $\text{mg}^{-1}$  proteína) nos diferentes órgãos de *A. patula*, *H. portulacoides*, *J. maritimus* e *P. australis* colhidas no Esteiro de Estarreja. Os valores são médias  $\pm$  erro padrão de 3 a 6 réplicas. Letras iguais significa que não existem diferenças significativas entre os vários órgãos ( $P > 0,05$ ).

Na Figura III-4 encontra-se expresso o conteúdo em proteínas carboniladas nos vários órgãos das diferentes espécies vegetais. A espécie que revelou menores níveis de proteínas oxidadas em todos os órgãos foi *A. patula*, não apresentando diferenças significativas ( $P > 0,05$ ) entre si, enquanto que *H. portulacoides* apresentou uma maior oxidação proteica nas folhas e raízes ( $P < 0,05$ ). As monocotiledóneas exibiram valores mais elevados de oxidação proteica nos órgãos subterrâneos, particularmente na raiz de *P. australis* ( $P < 0,05$ ). De um modo geral, as raízes foram, em todas as espécies, o órgão com maior nível de proteínas oxidadas.

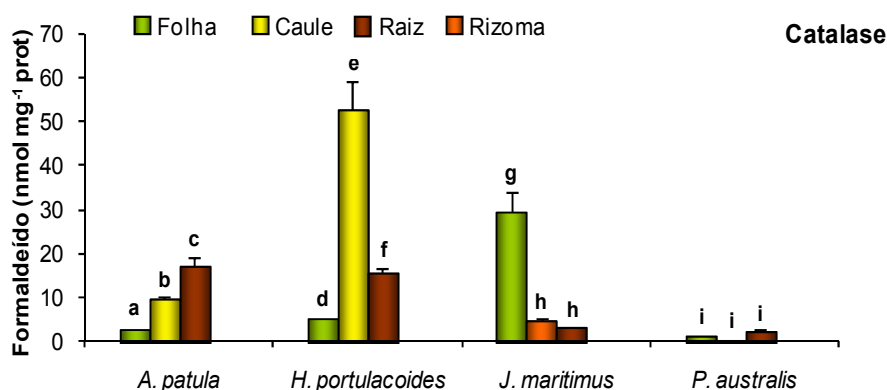
### 3.3 Enzimas antioxidantes

A actividade das principais enzimas envolvidas na defesa contra o stresse oxidativo foi determinada em todos os órgãos das várias espécies vegetais.



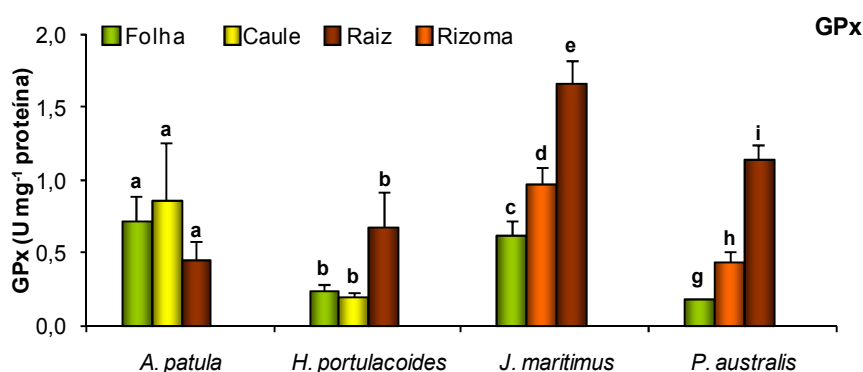
**Figura III-5:** Actividade da SOD ( $\text{U mg}^{-1}$  proteína) nos diferentes órgãos de *A. patula*, *H. portulacoides*, *J. maritimus* e *P. australis* colhidas no Esteiro de Estarreja. Os valores são médias  $\pm$  erro padrão de 3 a 6 réplicas. Letras iguais significa que não existem diferenças significativas entre os órgãos da mesma espécie ( $P > 0,05$ ).

A quantificação da actividade da SOD nas várias plantas em estudo encontra-se expressa na Figura III-5. Todas as espécies vegetais, com excepção de *J. maritimus*, apresentaram um padrão idêntico em que a actividade da SOD foi mais elevada nos órgãos subterrâneos comparativamente aos órgãos aéreos. *A. patula* e *H. portulacoides* apresentaram diferenças significativas entre os seus órgãos ( $P < 0,05$ ), diminuindo a actividade da SOD da seguinte forma: raiz > caule > folha. É de salientar, no entanto, que de todas as plantas referidas, *J. maritimus* foi a única que não apresentou diferenças significativas de actividade de SOD entre os seus órgãos ( $P > 0,05$ ), enquanto que *P. australis* se destacou por exibir valores de actividade da enzima significativamente superiores na raiz em comparação com os outros órgãos ( $P < 0,05$ ).



**Figura III-6:** Actividade da CAT (nmol formaldeído  $\text{mg}^{-1}$  proteína) nos diferentes órgãos de *A. patula*, *H. portulacoides*, *J. maritimus* e *P. australis* colhidas no Esteiro de Estarreja. Os valores são médias  $\pm$  erro padrão de 3 a 6 réplicas. Letras iguais significa que não existem diferenças significativas entre os órgãos da mesma espécie ( $P > 0,05$ ).

No que diz respeito à actividade da catalase, tal como se pode observar na Figura III-6, as plantas apresentaram comportamentos diferentes entre si. *A. patula* e *H. portulacoides* apresentaram diferenças significativas na actividade desta enzima entre os seus órgãos ( $P < 0,05$ ), sendo a folha o órgão com valores mais baixos em ambas as espécies. Em *J. maritimus*, os órgãos subterrâneos destacam-se, uma vez que exibiram valores de catalase significativamente inferiores quando comparados com as folhas ( $P < 0,05$ ). *P. australis* foi a espécie vegetal que exibiu níveis de actividade da catalase mais reduzidos, não apresentando diferenças significativas entre os seus órgãos ( $P > 0,05$ ).



**Figura III-7:** Actividade da GPx ( $\text{U mg}^{-1}$  proteína) nos diferentes órgãos de *A. patula*, *H. portulacoides*, *J. maritimus* e *P. australis* colhidas no Esteiro de Estarreja. Os valores são médias  $\pm$  erro padrão de 3 a 6 réplicas. Letras iguais significa que não existem diferenças significativas entre os órgãos da mesma espécie ( $P > 0,05$ ).

Outra enzima antioxidante avaliada neste estudo foi a glutathione peroxidase (GPx). Analisando a Figura III-7 verifica-se que existem tendências diferentes entre os dois grupos de plantas: dicotiledóneas e monocotiledóneas. *A. patula* e *H. portulacoides* não exibiram diferenças significativas entre os seus órgãos ( $P > 0,05$ ), enquanto que em *J. maritimus* e em *P. australis* a actividade da GPx foi significativamente mais elevada nos órgãos subterrâneos comparativamente à parte aérea ( $P < 0,05$ ), embora *J. maritimus* tenha apresentado, em todos os órgãos, valores superiores aos de *P. australis*.



## 4. Discussão

Vários autores sugerem que metais, como o é o caso do Hg, provocam alterações metabólicas que induzem o aparecimento de stresse oxidativo (Halliwell e Gutteridge 1984; Elstner 1990; Patra e Sharma, 2000; Zhou et al., 2007). Alguns metais, nomeadamente o ferro e cobre, possuem a capacidade de induzir danos oxidativos devido ao seu poder de auto-oxidação associado às reacções de Fenton. Contudo, este tipo de acção não foi ainda descrito para o mercúrio em células vegetais (Schützendübel e Polle, 2002), embora existam evidências que demonstram a indução de stresse oxidativo em plantas após exposição a Hg (Cho e Park, 2000). Neste sentido, a primeira linha de defesa contra a acção deste metal será a prevenção da formação de ROS. No entanto, quando estes mecanismos de protecção não são eficientes, os ROS devem ser imediatamente eliminados, de modo a prevenir eventuais danos macromoleculares (Moller, 2001).

### 4.1 ROS e Danos oxidativos

A primeira etapa na formação de ROS, após a redução do  $O_2$ , dá origem ao radical superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) (Salin, 1987). No ambiente celular, o  $O_2^{\bullet-}$  torna-se extremamente nefasto, induzindo a peroxidação lipídica, o que enfraquece desse modo as membranas celulares (Levine et al., 1994; Willekens et al., 1997). Uma segunda redução gera  $H_2O_2$  (Levine et al., 1994; Willekens et al., 1997) cuja toxicidade está sobretudo relacionada com a oxidação dos grupos SH de diversas proteínas, nomeadamente enzimas importantes para o metabolismo celular (Van Assche e Clijsters, 1990).

Neste trabalho foi analisada a produção de  $O_2^{\bullet-}$ , como um indicador da presença de stresse oxidativo nos diferentes tecidos vegetais das espécies estudadas.

De um modo geral, a relação entre os níveis de  $O_2^{\bullet-}$  e os níveis de Hg varia entre órgãos dentro da mesma planta, havendo uma diferença de comportamento entre dicotiledóneas e monocotiledóneas. As espécies dicotiledóneas *A. patula* e *H. portulacoides*, embora apresentem uma distribuição de Hg semelhante nos três órgãos (Tabela II-3), têm conteúdos em radical  $O_2^{\bullet-}$  superiores nos órgãos aéreos, em particular nas folhas (Figura III-2). Vários trabalhos concluíram que muitas espécies acumulam preferencialmente os metais pesados nos seus órgãos subterrâneos, de modo a protegerem

os órgãos aéreos que são mais sensíveis à toxicidade metálica (Patra et al., 2004; Poschenrieder e Barceló, 2003). Nas dicotiledóneas a acumulação de Hg nas folhas parece induzir níveis mais elevados de  $O_2^{\bullet-}$ , possivelmente devido ao facto de o Hg interferir na cadeia transportadora de electrões da maquinaria fotossintética. De acordo com vários autores, o Hg afecta o processo fotossintético, em particular a actividade da cadeia transportadora de electrões no fotossistema II, originando assim uma maior acumulação de ROS (Bernier et al., 1993; Bernier e Carpentier, 1995; Clijsters e Van Assche, 1985; Krupa e Baszynski, 1995; Patra et al., 2004 e Sersen et al., 1998). As raízes das dicotiledóneas, por sua vez, não foram tão afectadas apesar de apresentarem concentrações de Hg semelhantes às folhas. Possivelmente, este facto deve-se a nas raízes não ocorrer a formação de ROS com origem fotossintética. Contrariamente, as monocotiledóneas *J. maritimus* e *P. australis* acumularam valores mais baixos de Hg nas folhas (Tabela II-3), possivelmente justificando os valores igualmente mais baixos de radical  $O_2^{\bullet-}$  (Figura III-2). Contudo, os órgãos com maior acumulação de Hg, nomeadamente o rizoma de *J. maritimus* e a raiz de *P. australis* apresentaram uma maior formação de  $O_2^{\bullet-}$ . Assim, os resultados obtidos indiciam que a acumulação de Hg nas diferentes espécies está directamente relacionada com a produção do radical  $O_2^{\bullet-}$ . Vários trabalhos demonstraram já o aumento da formação de ROS induzido por mercúrio em várias plantas, nomeadamente em *Medicago sativa*, *Sesbania drummondii*, *Lycopersicon esculentum* e *Cucumis sativus* (Cargnelutti et al., 2006; Cho e Park, 2000; Israr e Sahi, 2006; Ortega-Villasante et al., 2006; Patra e Sharma, 2000; Zhou et al., 2007, 2008).

Em condições metabólicas normais, a acumulação de ROS é controlada por vários tipos de defesas antioxidantes (Del Río et al., 2006). Contudo, em condições de stresse, como é o caso de metais, a produção de ROS pode ser incrementada, afectando várias funções a nível celular, nomeadamente ao nível de lípidos (Sandalio et al., 2001), proteínas (Romero-Puertas et al., 2002) e outras macromoléculas (Hall, 2000). Os níveis de peroxidação lipídica e de carbonilação proteica funcionam como indicadores dos danos celulares que a célula sofreu devido à presença de ROS e também como uma medida do nível de stresse em que as plantas se encontram (Halliwell e Gutteridge, 1999; Mueller, 2004).

Deste modo, foram determinados os níveis de oxidação proteica e lipídica nos diferentes órgãos das plantas estudadas. De um modo geral, verifica-se que, em todas as

plantas, o órgão vegetal com maiores níveis de lípidos oxidados são as folhas (Figura III-3). Este resultado pode ir de encontro ao facto de a folha *per se* ser o órgão vegetal com os maiores níveis de lípidos. Analisando os resultados obtidos, verifica-se, uma vez mais, que as dicotiledóneas se distinguem das monocotiledóneas. Em *A. patula* e *H. portulacoides* a acumulação de  $O_2^{\bullet-}$  parece estar associada a uma maior acumulação de peroxidação lipídica, principalmente nas folhas (Figuras III-2 e III-3). Contudo, o mesmo não se verifica em termos de oxidação proteica (Figura III-4). Nas monocotilédoneas *J. maritimus* e *P. australis* a maior acumulação de  $O_2^{\bullet-}$  verifica-se nos órgãos subterrâneos e não está associada a níveis mais elevados de peroxidação lipídica, mas parece estar fortemente associada a uma maior oxidação proteica, particularmente na raiz de *P. australis*. Existem dados na literatura que apoiam os resultados obtidos neste trabalho, em que a formação de oxidação lipídica e proteica induzida por Hg está directamente relacionada com a produção excessiva de ROS em várias espécies vegetais (Ali et al., 2000; Cargnelutti et al., 2006; Chen et al., 2008; Cho e Park, 2000; Esteban et al., 2008; Moreno-Jimenez, et al., 2007; Ortega-Villasante et al., 2005; Rellán-Álvarez et al., 2006; Vázquez et al., 2001; Zhou et al., 2007, 2008). No entanto, estes danos oxidativos podem também dever-se à presença de outras espécies reactivas de oxigénio, nomeadamente  $H_2O_2$  e o radical  $OH^{\bullet}$ , capazes de oxidar várias biomoléculas. Halliwell e Gutteridge (1999) sugeriram que a peroxidação lipídica e a carbonilação proteica são iniciadas maioritariamente pelo radical  $OH^{\bullet}$ , entrando seguidamente as outras ROS em acção. Assim, os resultados obtidos indicam que a acumulação do radical  $O_2^{\bullet-}$  induzida por mercúrio parece induzir danos oxidativos. A acumulação preferencial destes dois tipos de danos parece diferir consoante o órgão onde se observa maiores níveis de  $O_2^{\bullet-}$ . As folhas das várias espécies sofrem maior peroxidação lipídica, provavelmente devido ao elevado conteúdo em lípidos que este órgão possui. As raízes, uma vez que contém menor quantidade de lípidos, sofreram mais danos oxidativos a nível proteico.

## 4.2 Enzimas antioxidantes

Uma vez formados, os ROS devem ser imediatamente eliminados para minimizar os danos que possam provocar. Desta forma, os principais mecanismos de desintoxicação de ROS constituem a chamada “segunda linha de defesa” antioxidante (Moller, 2001). Estas defesas são levadas a cabo por enzimas que interrompem as cascatas de oxidação em diferentes fases (Noctor e Foyer, 1998). Destas fazem parte integrante a SOD, a GPX e a CAT. Neste contexto, foram analisados os níveis de actividade destas enzimas nas várias espécies estudadas, de forma a tentar compreender a sua relação com os níveis de ROS, danos oxidativos e de mercúrio.

A nível celular, a SOD constitui a primeira linha de defesa contra o radical  $O_2^{\bullet-}$ , convertendo-o em  $O_2$  e  $H_2O_2$  (Alscher et al., 2002), sendo descrita como uma das mais importantes defesas antioxidantes. Através da sua acção, a SOD diminui o risco de formação do radical  $OH^{\bullet}$  que possui elevada reactividade, promovendo o aparecimento de vários danos oxidativos (Bowler et al., 1992).

Tendo como base os resultados obtidos, constata-se que as espécies apresentaram comportamentos diferentes no que concerne à actividade da SOD. Nas dicotiledóneas os órgãos com menor actividade da SOD (Figura III-5) apresentaram níveis mais elevados de radical superóxido (Figura III-2). Em *J. maritimus*, também parece haver uma relação inversa entre a actividade da SOD e a acumulação de Hg (Tabela II-3), uma vez que a acumulação de  $O_2^{\bullet-}$  (Figura III-2) não é coincidente com os níveis de actividade da SOD (Figura III-5). Os resultados obtidos poderão assim justificar os níveis mais elevados de  $O_2^{\bullet-}$  nestas três espécies e consequentemente o aumento dos níveis de peroxidação lipídica observados. Assim, os resultados indicam que plantas que colonizam ambientes contaminados por mercúrio podem diminuir os níveis de SOD, podendo levar à acumulação de ROS e de danos oxidativos nos seus órgãos.

*P. australis*, por sua vez, destacou-se das outras espécies por apresentar, principalmente na raiz, níveis mais elevados de  $O_2^{\bullet-}$  associados a níveis mais elevados de SOD induzidos por Hg, explicando os níveis mais elevados de oxidação proteica detectados nas raízes. Estes resultados indicam que a actividade da SOD em *P. australis* é mediada pelos ROS em condições de stresse por mercúrio.

Assim, e de acordo com os resultados obtidos, parece haver aumentos e diminuições da actividade da SOD nas várias espécies estudadas. Estes resultados poderão ser explicados com base na espécie e nos órgãos, bem como na acumulação de Hg, nomeadamente ao nível da absorção, compartimentação e respostas celulares.

Aumentos na actividade da SOD foram já descritos em várias espécies expostas a Hg, nomeadamente *Kandelia candel* e *Bruguiera gymnorhiza* (Zhang et al., 2007), *Lycopersicon esculentum* (Cho e Park, 2000), *Sesbania drummondii* (Israr e Sahi, 2006) e *Lupinus albus* (Esteban et al., 2008). Existe igualmente informação na literatura referente à vulnerabilidade da SOD face ao excesso de metais incluindo Hg, podendo contribuir para a sua parcial ou total inactivação (Escobar et al., 1996; Garçon et al., 2006), o que é concordante com os resultados obtidos em *A. patula* e *H. portulacoides* mas discordantes dos resultados obtidos em *P. australis*.

O produto da actividade da SOD é o  $H_2O_2$  que apresenta elevada toxicidade, devendo portanto ser eliminado em reacções subsequentes. Em plantas, existem várias enzimas que regulam os níveis intracelulares de  $H_2O_2$ , sendo as mais importantes a catalase, a glutathione peroxidase e a ascorbato peroxidase (Noctor e Foyer, 1998; McKersie e Leshem, 1994). A catalase é uma enzima antioxidante fundamental na eliminação do stresse oxidativo. A sua função centra-se na remoção do  $H_2O_2$ , reduzindo-o a  $H_2O$ , protegendo assim os tecidos vegetais contra eventuais danos oxidativos (Mika et al., 2004; McKersie e Leshem, 1994). Tal como a CAT, a GPx reduz igualmente o  $H_2O_2$  a  $H_2O$ , mas usa GSH directamente como agente redutor e encontra-se maioritariamente no citoplasma, enquanto que a CAT actua principalmente nos peroxissomas (Asada e Takahashi, 1987). Além disso, a GPx também actua sobre os hidroperóxidos resultantes da peroxidação de biomoléculas, reduzindo assim os níveis de peroxidação lipídica (Sabeh et al., 1993).

Os resultados obtidos sugerem que nas folhas das dicotiledóneas e nos órgãos subterrâneos de *J. maritimus* a actividade da catalase (Figura III-6), tal como a actividade da SOD (Figura III-5), apresenta valores mais baixos em comparação com os restantes órgãos. Estes resultados parecem justificar os níveis mais elevados de peroxidação lipídica e oxidação proteica detectados nestes órgãos (Figuras III-3 e III-4). Resultados semelhantes foram obtidos por Cargnelutti et al. (2006) em que a actividade da catalase sofreu um acentuado decréscimo em *Cucumis sativus* após exposição a elevadas concentrações de mercúrio.

Em *P. australis* a actividade da catalase (Figura III-6) não parece estar associada à acumulação de Hg nos vários órgãos (Tabela II-3), podendo justificar os níveis mais elevados de oxidação proteica observados na raiz (Figura III-4).

De um modo geral, a ineficiência da SOD e da CAT nas várias espécies indicam que os mecanismos de eliminação de ROS poderão ser menos eficazes, uma vez que a actividade da catalase coordenada com a actividade da SOD protagonizam uma importante função protectora nos processos de eliminação de  $O_2^{\cdot-}$  e  $H_2O_2$  (Badawi et al., 2004; Liang et al., 2003; Mittova et al., 2002). Como consequência verificou-se um aumento de danos oxidativos.

Relativamente à GPx, e de acordo com os resultados obtidos, observa-se que existe, uma vez mais, uma clara diferença entre dicotiledóneas e monocotiledóneas. Em *A. patula* e *H. portulacoides*, ao contrário da SOD e da CAT que apresentam valores mais baixos nas folhas, a actividade da GPx é semelhante entre os três órgãos (Figura III-7), sugerindo que a actividade desta enzima nestas espécies não parece desempenhar um papel preponderante na defesa contra danos oxidativos. Como consequência, observaram-se níveis mais elevados de peroxidação lipídica nas folhas (Figura III-3). Nas monocotiledóneas, os valores mais elevados de GPx nos órgãos subterrâneos parecem estar associados aos valores mais elevados de Hg, podendo ser a razão pela menor peroxidação lipídica observada nestes órgãos.

Resumindo, a actividade das enzimas antioxidantes neste trabalho revelou tendências diferentes de acordo com a espécie em questão. Foi já descrito que os metais causam alterações na actividade das enzimas antioxidantes, apesar de as respostas serem, por vezes, contraditórias. Algumas das respostas ao stresse imposto por metais têm sido atribuídas à actividade das enzimas antioxidantes (Sanita di Toppi e Gabbrielli, 1999). Existem aumentos ou diminuições na actividade de várias enzimas dependendo do órgão, da espécie em causa, da concentração e do tempo de exposição ao metal tal como descrito por Schützendübel e Polle (2002).

### 4.3 Conclusões gerais

Os resultados apresentados demonstram que o mercúrio, de um modo geral, parece estar associado ao aumento de ROS (radical  $O_2^{\bullet-}$ ) e de danos oxidativos (peroxidação lipídica e oxidação proteica) nas espécies estudadas. No entanto, ao comparar as diferentes espécies vegetais, conclui-se que *A. patula* é a espécie que se encontra em maior stresse oxidativo induzido por mercúrio, em particular nos órgãos aéreos, devido aos níveis mais elevados de  $O_2^{\bullet-}$  e peroxidação lipídica encontrados. Contrariamente, as espécies com níveis menores de stresse oxidativo são *J. maritimus* e *P. australis* pois apresentam os níveis mais baixos de  $O_2^{\bullet-}$  nas folhas, valores inferiores de peroxidação lipídica nos órgãos subterrâneos e níveis inferiores de oxidação proteica nas folhas. Estas diferenças de danos oxidativos entre as espécies podem dever-se à acção das enzimas antioxidantes. As dicotiledóneas apresentam, particularmente nas folhas, níveis mais baixos de actividade da CAT, SOD e GPx, possivelmente devido à acção directa do mercúrio. Contrariamente, as monocotiledóneas apresentam valores mais elevados de GPx nos órgãos subterrâneos e na raiz de *P. australis* observaram-se níveis mais elevados de actividade da SOD, induzidas provavelmente pela maior acumulação de Hg nestes órgãos.

# **Capítulo IV**

---

## **Agentes de complexação metálica: fitoquelatinas**

---

---

### **1. Introdução**

De modo a sobreviverem em ambientes contaminados por metais, as plantas desenvolveram mecanismos de tolerância à sua toxicidade.

A sequestração intracelular de metais é um mecanismo importante para minimizar os seus efeitos tóxicos nas células. Existem vários compostos quelantes de metais em plantas, nomeadamente ácidos orgânicos, metalotioninas e aminoácidos (Rauser, 1999), porém, um dos mecanismos de tolerância mais importantes em plantas é a síntese de metalotioninas de classe III, normalmente designadas por fitoquelatinas (PCs).

#### **1.1 Estrutura e biossíntese das fitoquelatinas**

As PCs são uma família de pequenos péptidos não proteicos, rica em grupos SH que complexa metais, sendo o mecanismo de desintoxicação mais descrito em plantas (Ortiz et al., 1995; Vögeli-Lange e Wagner, 1990), estando bem documentadas na literatura (Chen et al., 1997; Grill et al., 1986; Klapheck et al., 1994; Mehra et al., 1988; Meuwley et al., 1995). Estes péptidos são compostos apenas por três aminoácidos: glutamato (Glu), cisteína (Cis) e glicina (Gli), estando os aminoácidos Glu e Cis ligados por uma ligação  $\gamma$ -carboxilamida. Apresentam a estrutura geral  $(\gamma\text{-Glu-Cis})_n\text{-Gli}$  em que “n” pode variar entre 2 e 11, consoante o organismo e o nível de exposição ao metal



(Cobbett, 2000; Rauser, 1995; Zenk, 1996), sendo rapidamente induzidos em plantas após exposição a metais (Cobbett, 2000; Goldsbrough, 2000; Rauser, 1990; 1995; Zenk, 1996). As PCs existem em várias espécies vegetais, algumas algas, leveduras e nemátodes, bem como em fungos nomeadamente *Candida glabrata* e *Mucor racemosus* (Cobbett e Goldsbrough, 2002; Grill et al., 1986; Mehra et al., 1988; Miersch et al., 2001; Rauser 1999; Zenk, 1996). Várias variantes estruturais de PCs foram já identificadas em algumas espécies vegetais, diferindo das PCs pelo seu aminoácido terminal, nomeadamente ( $\gamma$ -Glu-Cis) $_n$ - $\beta$ Ala (homo-fitoquelatinas) (Grill et al., 1986), ( $\gamma$ -Glu-Cis) $_n$ -Ser (hidroximetil-fitoquelatinas) (Klapheck et al., 1992) e ( $\gamma$ -Glu-Cis) $_n$ -Glu (Cobbett, 2000; Cobbett e Goldsbrough, 2002; Gaur e Rai, 2001; Meuwly et al., 1993; Rauser, 1995; 1999; Zenk, 1996).

Vários estudos fisiológicos, bioquímicos e genéticos demonstraram que a glutathione (GSH) (ou em alguns casos, variantes estruturais) constitui o substrato para a síntese de fitoquelatinas (Cobbett, 2000; Rauser, 1995, 1999; Xiang et al., 2001; Yan et al., 2000; Zenk, 1996). A percepção de que estas surgiam da extensão da molécula de GSH foi baseada na sua semelhança estrutural e no seu desaparecimento concomitante com a formação das fitoquelatinas. Outros estudos corroboraram esta hipótese, ao demonstrar a redução ou anulação da síntese de fitoquelatinas em plantas com deficiência ou inexistência da glutathione sintetase ou ainda sujeitas a uma inibição da síntese de GSH pela glutathione sulfoximina (BSO) (De Knecht et al., 1994; Rauser, 1995; Xiang et al., 2001; Yan et al., 2000). Actualmente, a caracterização mais detalhada da biossíntese das PCs surgiu de estudos realizados em *Schizosaccharomyces pombe* e em *Arabidopsis*. Estudos genéticos confirmaram que mutantes de levedura e *Arabidopsis* deficientes em GSH são hipersensíveis a Cd e igualmente deficientes na síntese de PCs (Cobbett et al., 1998).

A biossíntese enzimática das fitoquelatinas foi atribuída a uma enzima específica, a  $\gamma$ -Glu-Cis-dipeptidil transpeptidase (EC 2.3.2.15) (Vatamaniuk et al., 2004), ou, genericamente designada, fitoquelatina sintetase (PCS) (Grill et al., 1989). Esta enzima catalisa a transpeptidação do grupo  $\gamma$ -Glu-Cis da GSH para uma segunda molécula de GSH, formando uma molécula de fitoquelatina (PC<sub>2</sub>), produzindo um oligómero n+1 e, assim sucessivamente, formando moléculas com diferentes comprimentos de cadeia (De Knecht et al., 1995; Grill et al., 1987, 1989; Hayashi et al., 1988; Klapheck et al., 1995; Yoshimura et al., 1990). A sua síntese ocorre no citosol através da seguinte reacção:



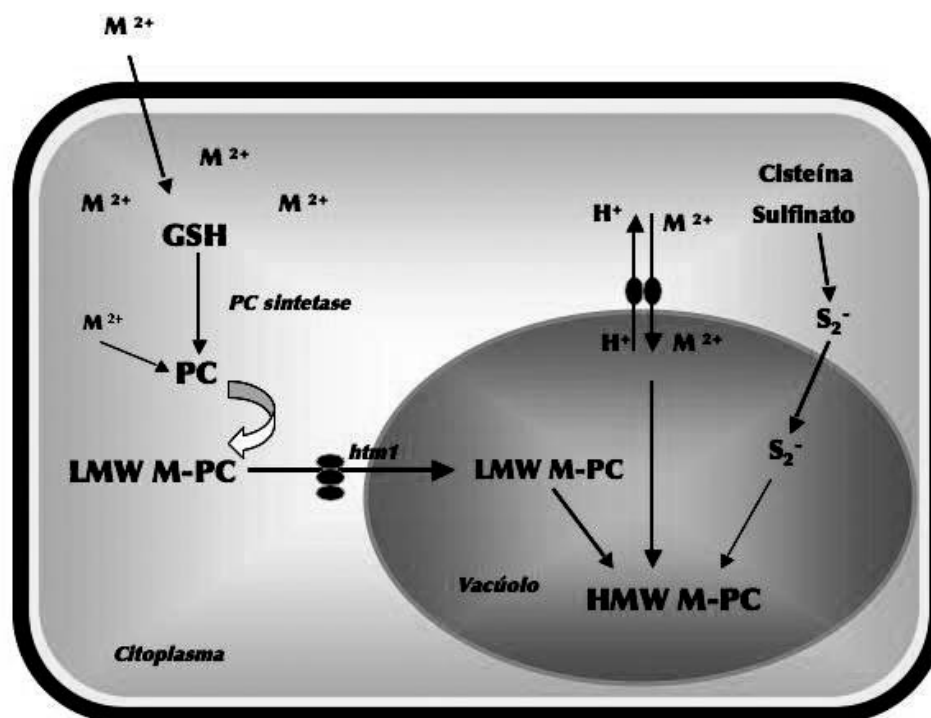
Diversos estudos comprovaram que a fitoquelatina sintetase é constitutiva em *Schizosaccharomyces pombe* (Hayashi et al., 1988; Yoshimura et al., 1990) e em diversas plantas (De Knecht et al., 1995; Grill et al., 1987; Klapheck et al., 1995). No entanto, foi referido que a sua actividade pode ser desencadeada por diversos iões metálicos (Cd, Cu, Ag, Hg, Zn, Sn, Au e Pb) (Hartley-Whitaker, 2001; Nieboer e Richardson, 1980). Subsequentemente, estes iões podem ser complexados pelas PCs induzidas via coordenação tiolada (Grill et al., 1985; Grill, 1989; Mehra et al., 1995, 1996; Mehra e Mulchandani, 1995; Salt et al., 1995; Strasdeit et al., 1991). Foi igualmente observado que a actividade *in vivo* e *in vitro* desta enzima só é despoletada na presença destes iões metálicos e a sua actividade apenas se mantém enquanto existe metal livre (Chen et al., 1997; Grill et al., 1989). Estes factos sugerem a presença de um mecanismo de auto-regulação da biossíntese de fitoquelatinas, em que o produto da reacção complexa o metal activo, terminando, simultaneamente, a reacção. Com base na concentração óptima de activação enzimática, a ordem de eficácia dos diferentes metais foi demonstrada ser a seguinte: Cd > Ag > Pb > Cu > Hg > Zn > Sn > Au (Zenk, 1996).

## 1.2 A complexação de metais e sequestração no vacúolo

Para reduzir a toxicidade dos metais, as fitoquelatinas ligam-se aos iões metálicos formando complexos compostos por múltiplos péptidos heterogéneos no seus comprimentos e por iões metálicos (Klapheck et al., 1994). Têm sido, sobretudo, estudados os complexos formados com iões de cádmio, uma vez que este metal é um poderoso indutor de fitoquelatinas. As características e composição destes complexos podem variar consideravelmente nos diferentes organismos, dependendo da concentração metálica utilizada, do tempo de exposição e do meio nutritivo (Rauser e Meuwly, 1995).

A última etapa na desintoxicação de metais envolve a acumulação de complexos metal-PCs no vacúolo (Salt et al., 1998; Schatt et al., 2000). Segundo Zenk (1996), o vacúolo torna-se o compartimento ideal para o armazenamento de metais tóxicos, dado que

estes ficam impossibilitados de inibir as reacções metabólicas mais importantes. Ortiz et al. (1995) revelaram que o gene *hmt1* codifica uma família de transportadores membranares tipo ABC que transportam as proteínas para o tonoplasto em leveduras. Em plantas, a sequestração de PCs para o vacúolo também foi observada (Vögeli-Lange e Wagner, 1990) através de um transportador de prótons dependente de MgATP, similar a HTM1 (Salt e



**Figura IV-1:** Modelo proposto para a complexação de metais pesados por fitoquelatinas.

Na presença de íões metálicos, as fitoquelatinas (PCs) são sintetizadas pela enzima fitoquelatina sintetase (PCS) usando GSH como substrato. Consequentemente, as PCs formam, no citosol, um complexo de menor peso molecular (LMW) com os íões metálicos. Este complexo é então transportado para o vacúolo pelo transportador HTM1, onde são incorporados outros íões metálicos e cristais de  $S_2^{2-}$ , formando um complexo de maior peso molecular (HMW), com maior estabilidade.

Rauser, 1995). Uma vez dentro do vacúolo, outros íões metálicos juntamente com  $S_2^{2-}$  são adicionados ao complexo para produzir uma estrutura mais estável e de peso molecular superior (Dameron et al., 1989; Kneer e Zenk, 1997; Steffens, 1990; Zenk, 1996).

Com base nestas descobertas, Ortiz et al. (1995) propuseram um modelo da sequestração de metais pelas PCs que tem sido amplamente aceite pela comunidade científica (Figura IV-1): quando os íões metálicos entram na célula, a PCS é activada, catalisando a síntese

de PCs no citosol. Estas sequestram os íons metálicos, formando um primeiro complexo de menor peso molecular (LMW). Este complexo é transportado para o vacúolo através de um transportador denominado HMT1 (Ortiz et al., 1995; Vatamaniuk et al., 2000) ou por transportadores homólogos (Salt e Rauser, 1995). Os íons metálicos (Speiser et al., 1992) e  $S^{2-}$  são adicionados posteriormente ao complexo LMW, dando origem ao complexo de maior peso molecular (HMW). Este último é mais estável no ambiente ácido do vacúolo e possui uma maior estabilidade que o complexo LMW (Ortiz et al., 1995; Zenk 1996). Uma vez no interior do vacúolo, os íons metálicos são imobilizados, reduzindo a toxicidade para o restante ambiente celular.

### 1.3 A importância das fitoquelatinas na tolerância a metais

As fitoquelatinas têm sido, em muitos estudos, associadas à tolerância aos metais, sendo o cádmio o metal mais estudado (Grill et al., 1987; Kneer e Zenk, 1992; Rauser, 1995, 1999; Zenk, 1996). Estas evidências são corroboradas por vários estudos de inibição (Grill et al., 1987; Gussarson et al., 1996; Reese e Wagner, 1987), bioquímicos (Kneer e Zenk, 1992) e de análise de mutantes (Ha et al., 1999; Howden et al., 1995; Mutoh e Hayashi, 1988). Tem sido sugerido que a quantidade de fitoquelatinas induzida por cádmio parece estar, *grosso modo*, relacionada com as concentrações de metal e os tempos de exposição (Sanità di Toppi e Gabrielli, 1999). Grill et al. (1987) e Vögelli-Lange e Wagner (1997) demonstraram uma correlação positiva entre a duração, o nível de exposição a cádmio e o número de unidades de  $\gamma$ -Glu-Cis repetidas. Outros autores também apontam o aumento da tolerância como resultado de uma superprodução de PCs (Bennetzen e Adams, 1984; Steffens et al., 1986), ou de uma síntese mais rápida das cadeias mais longas de PCs ( $n=2$ ,  $n=3$  ou  $n=4$ ) (Delhaize et al., 1989) com a subsequente formação de complexos mais estáveis que os formados pelas cadeias mais curtas (Hayashi e Nakagawa, 1988). Estes resultados sugerem que a formação de cadeias de PCs com maior número de repetições poderá ser mais importante para a tolerância do que a capacidade de síntese de fitoquelatinas em si.

Além do cádmio, existem evidências que demonstram a importância das fitoquelatinas na tolerância a outros metais, nomeadamente na tolerância a mercúrio. Mutantes *cad-1* de *Arabidopsis* deficientes na síntese de PCs revelaram-se extremamente

sensíveis a Hg (Howden e Cobbett, 1992). A inibição da síntese de PCs com um inibidor da PC sintetase, o BSO, aumentou a sensibilidade a Hg em *Hydrilla verticillata* e *Vallisneria spiralis* (Gupta et al., 1998). Mehra et al. (1996) demonstrou *in vitro* uma rápida transferência do Hg da glutatona para as fitoquelatinas e das fitoquelatinas de cadeia mais curta para as de cadeia mais longa. A intensidade da ligação de Hg à glutatona e fitoquelatinas cresce da seguinte forma:  $GSH < PC_2 < PC_3 < PC_4$ . Em culturas de *Rubia tinctorum*, o Hg induziu igualmente PCs e os seus derivados desglicil (Maitani et al., 1996). A importância das PCs na protecção contra os efeitos tóxicos de mercúrio e cádmio foi demonstrada por Maitani et al. (1996) que testou várias enzimas de plantas sensíveis a metais, com o intuito de analisar a importância dos complexos de fitoquelatinas na tolerância. Quando comparadas com o ião metálico sob a forma livre, as actividades enzimáticas foram de dez a cem vezes mais elevadas quando Hg e Cd estavam sob a forma complexada.

Apesar de apontadas como o principal mecanismo de tolerância a metais, as fitoquelatinas poderão, em algumas situações, não ser o principal mecanismo, particularmente em exposições mais intensas ou mais prolongadas (Cobbett, 2000; Ernst et al., 1992; Goldsbrough, 2000; Meharg, 1994; Steffens, 1990; Zenk, 1996).

Alguns trabalhos recentes têm sugerido que em certas espécies tais como *Vicia faba*, *Pisum sativum*, *Phaseolus vulgaris* e *Silene vulgaris*, as fitoquelatinas possuem apenas um papel transitório na tolerância e que, em níveis de stresse mais elevados, poderão não estar sempre associadas a uma maior tolerância, havendo outros mecanismos que poderão ser activados (Leopold et al., 1999; Piechalack et al., 2002; Sanità di Toppi e Gabrielli, 1999). Esta controvérsia leva-nos a questionar a importância das PCs em plantas que estão cronicamente sujeitas a contaminações ambientais. Contudo, existe uma lacuna na literatura sobre a síntese e consequente importância das PCs no ambiente. Até à presente data, apenas alguns trabalhos demonstraram que algumas espécies de árvores (*Rhamnus frangula*, *Acer platanoides*, *Betula populifolia*, *Betula papyrifera*, *Populus alba*, *Abies balsamea* e *Populus tremuloides*) e as plantas *Opuntia ficus* e *Ricinus communis* que habitam locais contaminados por metais produzem PCs nos seus órgãos, sendo sugerida a sua utilização como bioindicadores de contaminação ambiental, particularmente por chumbo, cobre, cádmio e níquel (Gawel et al., 2001; Gawel e Hemond, 2004; Figueroa et al., 2007; 2008).

## 1.4 Objectivos

Embora exista um conjunto considerável de literatura que comprova a importância das PCs na tolerância a mercúrio, toda ela é efectuada em laboratório, utilizando exposições muito curtas e em plantas jovens. Assim, os resultados já publicados poderão induzir a conclusões erróneas e controversas acerca da síntese de fitoquelatinas e da sua importância real na tolerância a diferentes níveis de stresse ambiental por mercúrio. Poucos trabalhos, até à presente data, abordaram a temática do papel dos tióis na tolerância a metais em plantas que colonizam ambientes contaminados. A quantificação de PCs é igualmente importante para determinar a sua importância na acumulação de mercúrio. Neste contexto, o objectivo deste capítulo foi estudar o papel das fitoquelatinas na tolerância ao mercúrio em plantas de sapal.

Procurou-se então:

- Analisar os níveis dos agentes complexantes, glutathione e fitoquelatinas, nos vários órgãos das plantas de sapal estudadas e relacionar a sua presença com os níveis de mercúrio acumulados por cada espécie;
- Averiguar o papel destes agentes quelantes nos processos de acumulação e translocação do metal dos tecidos subterrâneos para os tecidos aéreos nas várias plantas;

## **2. Material e Métodos**

### **2.1 Extracção e separação dos tióis por HPLC**

As amostras vegetais foram homogeneizadas a um pH ácido, para extrair os tióis e libertar os iões metálicos. Os grupos tiol foram reduzidos e derivatizados, previamente, à sua separação por HPLC, do seguinte modo:

#### **2.1.1 Homogeneização do material vegetal**

O material vegetal congelado a  $-80^{\circ}\text{C}$  foi transferido para um almofariz, previamente arrefecido, onde foi homogeneizado em HCl a 0,1 N, na proporção de 1 g de material vegetal para 3 ml de ácido e sob uma corrente de azoto líquido (Klapheck et al., 1995). O extracto foi, então, centrifugado a 50000 g, durante 10 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$  e os sobrenadantes resultantes foram imediatamente utilizados ou congelados a  $-80^{\circ}\text{C}$  para posterior utilização (Klapheck et al., 1988, 1995).

#### **2.1.2 Redução e derivatização dos tióis**

O procedimento de redução de GSH e PCs foi adaptado de Klapheck et al. (1988, 1995): 100  $\mu\text{l}$  do sobrenadante foram neutralizados em tubos Eppendorf com NaOH a 0,1 M, após adição de 200  $\mu\text{l}$  de 0,1 M Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA e 25  $\mu\text{l}$  de 2 mM DTE. Após incubação durante 1 hora à temperatura ambiente, foram adicionados, em condições de escuridão, 80  $\mu\text{l}$  de 10 mM monobromobimano (mBBr), previamente diluído em acetonitrilo. A derivatização decorreu durante 40 minutos, no escuro, a uma temperatura de  $30^{\circ}\text{C}$  (Sneller et al., 2000). A reacção foi terminada com a adição de ácido acético a 5%, até perfazer um volume total de 1,5 ml. As amostras foram imediatamente analisadas ou armazenadas a  $4^{\circ}\text{C}$  para posterior análise.

### **2.1.3 Separação e identificação dos tióis por HPLC**

Os derivados de bimanó foram separados por cromatografia de fase reversa, em HPLC (Gilson, modelo 385 e 306), como descrito por Klapheck et al. (1995). Antes da injeção, a coluna foi equilibrada com eluente A (0,01% TFA (v/v), em água desionizada), previamente, desgaseificado. As amostras foram filtradas através de uma membrana com poro de 0,2 µm, desgaseificadas durante 10 minutos em banho de ultra-sons e cerca de 20 µl foram injectados, manualmente, numa coluna RP C18 (250 x 4,6 mm i.d., 5µm, Gilson). A eluição foi efectuada a um fluxo de 1 ml min<sup>-1</sup>. Após cada corrida, a coluna foi equilibrada com eluente A durante 10 minutos antes de uma nova injeção. A fluorescência foi detectada num espectrofluorímetro (Jasco 821-FP Intelligent Spectrofluometer), com um comprimento de onda de excitação de 380 nm e detecção a 470 nm. Os picos de GSH, PC<sub>2</sub>, PC<sub>3</sub> e PC<sub>4</sub> foram identificados a partir de padrões GSH (Sigma) e de fitoquelatinas sintetizadas, (generosamente cedidas pelo Dr. M.H. Zenk, Departamento de Biologia, Universidade de München, Alemanha) com n variável entre 2 a 5. Os dados analíticos foram integrados através do software de integração Linetable.

## **2.2 Tratamento estatístico**

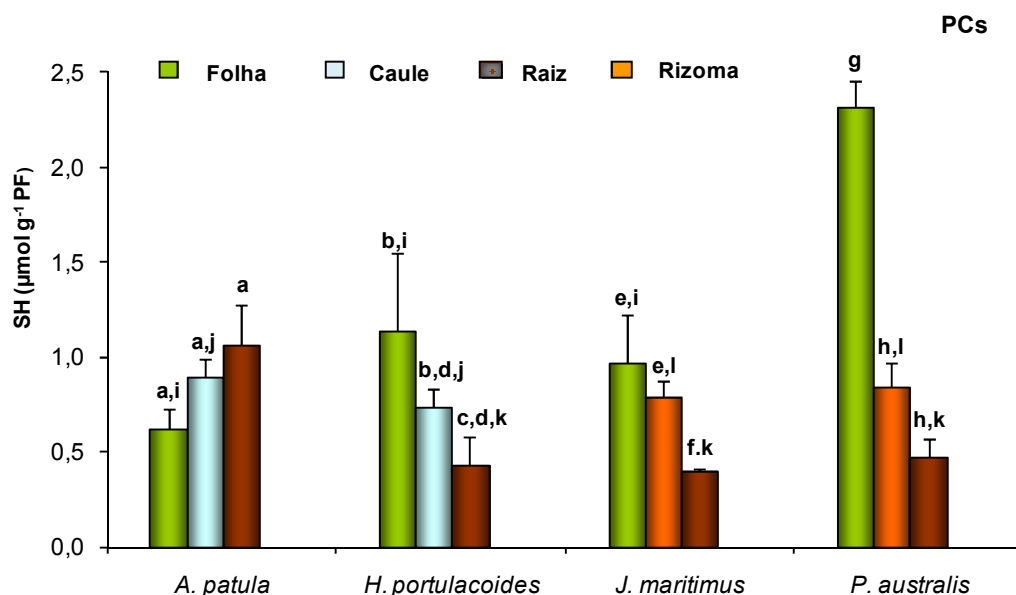
Em todos os ensaios efectuados, o grau de significância estatística foi determinado com base no teste da ANOVA uni ou bifactorial para valores de significância de P < 0,05. O tratamento estatístico foi realizado pelo programa SigmaStat versão 3.5.



## 3. Resultados

### 3.1 Síntese de fitoquelatinas

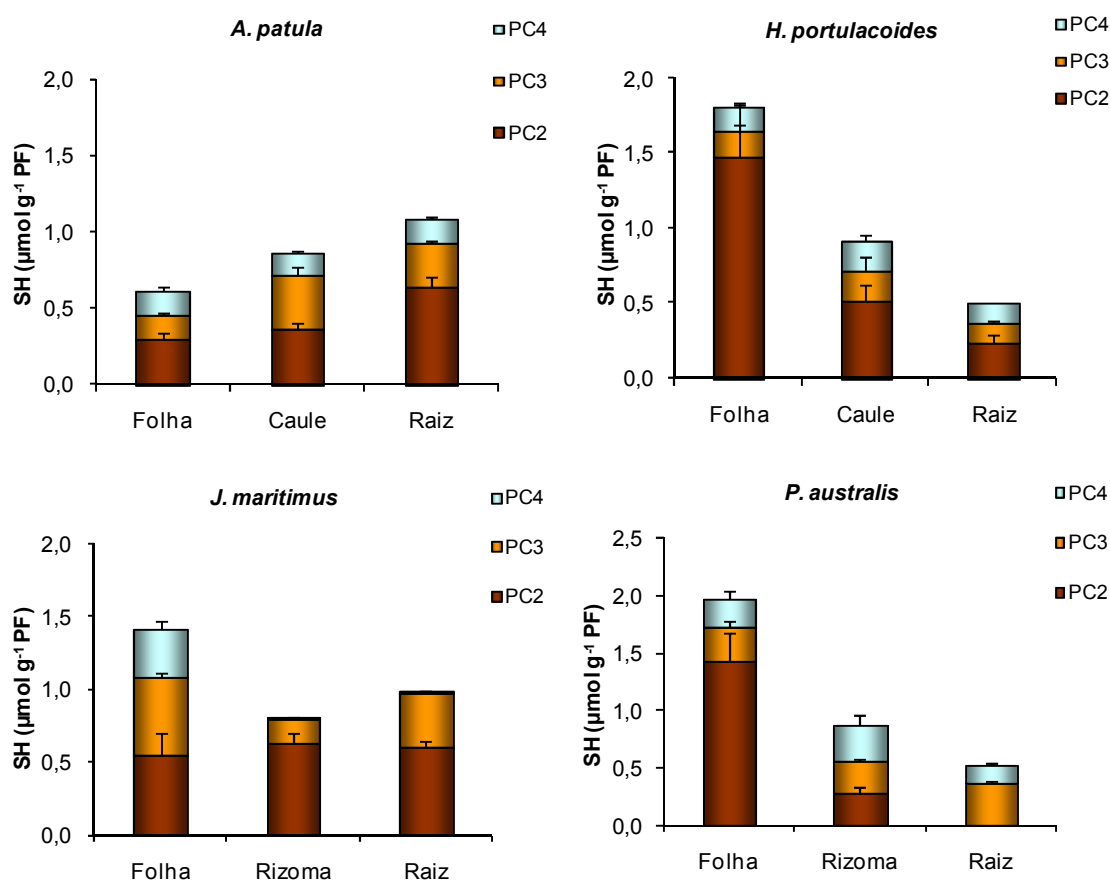
A figura IV-2 apresenta as concentrações de fitoquelatinas (PCs) totais produzidas nos órgãos das várias espécies vegetais estudadas. A presença de PCs foi detectada em todos os órgãos de todas as espécies. No entanto, no que concerne à sua acumulação e distribuição entre os órgãos, foram observadas diferenças entre as espécies. Enquanto *A. patula* apresentou valores significativamente semelhantes de PCs totais nos três órgãos ( $P > 0,05$ ), *J. maritimus* acumulou significativamente menos PCs na raiz ( $P < 0,05$ ). *H. portulacoides* e *P. australis* exibiram uma distribuição de PCs semelhante, apresentando níveis de PCs significativamente mais elevados nos órgãos aéreos em comparação com os seus órgãos subterrâneos ( $P < 0,05$ ). *A. patula* e *P. australis* destacaram-se por serem as espécies que acumularam os níveis mais elevados de PCs nas raízes e nas folhas, respectivamente ( $P < 0,05$ ).



**Figura IV-2:** Concentração de PCs ( $\mu\text{mol g}^{-1}$  peso fresco) presentes nos diferentes órgãos de *A. patula*, *H. portulacoides*, *J. maritimus* e *P. australis* colhidas no Esteiro de Estarreja. Os valores são médias  $\pm$  erro padrão de pelo menos 3 réplicas. Letras iguais significam que não existem diferenças significativas entre os órgãos ( $P > 0,05$ ).

A Figura IV-3 apresenta a constituição de PCs totais, em termos de comprimento de cadeia, nos órgãos das várias espécies.

Todas as plantas sintetizaram fitoquelatinas com cadeias compreendidas entre  $n=2$  e  $n=4$ . De um modo geral, nos órgãos das várias espécies vegetais os tamanhos das cadeias de fitoquelatinas decrescem na seguinte ordem:  $PC_2 > PC_3 > PC_4$ , sendo a  $PC_2$  a produzida em maiores quantidades. *J. maritimus* destacou-se por apenas apresentar fitoquelatinas de cadeia mais curta ( $n=2$  e  $n=3$ ) nos órgãos subterrâneos.



**Figura IV-3:** Concentração de  $PC_2$ ,  $PC_3$  e  $PC_4$  ( $\mu\text{mol g}^{-1}$  peso fresco) presentes nos diferentes órgãos de *A. patula*, *H. portulacoides*, *J. maritimus* e *P. australis* colhidas no Esteiro de Estarreja. Os valores são médias  $\pm$  erro padrão de pelo menos 3 réplicas.

### 3.2 Relação entre os níveis de GSH e PCs

**Tabela IV-1:** Razão entre os níveis de GSH e PCs totais presentes nos diferentes órgãos de *A. patula*, *H. portulacoides*, *J. maritimus* e *P. australis* colhidas no Esteiro de Estarreja. Os valores são médias de pelo menos 3 réplicas. Letras iguais significam que não existem diferenças significativas entre si ( $P > 0,05$ ).

Espécies	Razão GSH/PCs			
	Folha	Caule	Rizoma	Raiz
<i>A. patula</i>	12,9 <sup>a</sup>	4,2 <sup>b,i</sup>		2,8 <sup>b,k</sup>
<i>H. portulacoides</i>	2,5 <sup>c,h</sup>	3,9 <sup>c,i</sup>		3,3 <sup>c,k</sup>
<i>J. maritimus</i>	2,6 <sup>d,h</sup>		1,2 <sup>d,j</sup>	12,9 <sup>e,l</sup>
<i>P. australis</i>	2,6 <sup>f,h</sup>		4,6 <sup>f,j</sup>	7,3 <sup>g,l</sup>

Encontra-se na Tabela IV-1 a relação existente entre GSH e PCs através da razão entre as concentrações destes tióis nos órgãos das várias espécies vegetais. Observando a tabela, verifica-se que a razão GSH/PCs variou entre espécies. Em todas as plantas e em todos os órgãos, as concentrações de GSH foram sempre superiores às das fitoquelatinas. Em *A. patula* a razão GSH/PCs nas folhas foi significativamente maior quando comparada com os outros órgãos ( $P < 0,05$ ). Em *H. portulacoides* não se verificaram diferenças significativas, ou seja, a proporção entre GSH e PCs manteve-se constante ao longo dos órgãos ( $P > 0,05$ ). As espécies monocotiledóneas revelaram comportamentos semelhantes, apresentando razões significativamente superiores nas raízes ( $P > 0,05$ ) em comparação com os outros órgãos. Comparando as diferentes espécies, verifica-se que as folhas de *A. patula* se destacaram das outras espécies por apresentarem a razão GSH/PCs mais elevada ( $P < 0,05$ ). Nas raízes, foi possível observar diferenças entre os dois grupos de plantas: dicotiledóneas e monocotiledóneas. *J. maritimus* e *P. australis* exibiram razões GSH/PCs significativamente maiores quando comparadas com as duas dicotiledóneas ( $P < 0,05$ ).

## 4. Discussão

Uma vez que os metais imobilizados são menos tóxicos do que os metais na forma livre, as fitoquelatinas são consideradas o principal mecanismo de tolerância ao stresse imposto por metais na maioria das plantas vasculares (Grill et al., 1985; Zenk, 1996). Apesar dos vários trabalhos que foram efectuados nos últimos anos sobre o papel das fitoquelatinas na tolerância a metais, a investigação sobre a função destes péptidos em plantas que colonizam locais contaminados tem sido negligenciada. O mercúrio é um metal sem funções conhecidas nos organismos e que apresenta elevada fitotoxicidade quando presente nas plantas (Kabata-Pendias e Pendias, 1984). No entanto, informação relativa à acção que este metal exerce sobre a síntese de fitoquelatinas *in vivo* e *in vitro* é escassa (Cobbett, 2000; Mehra et al., 1995).

Havendo actualmente muitos locais contaminados por mercúrio e sabendo que a síntese de fitoquelatinas é um dos principais mecanismos de tolerância a metais em plantas, torna-se premente averiguar a existência destes péptidos em plantas que colonizam locais contaminados por este metal e compreender o seu contributo para a tolerância.

### 4.1 A indução de fitoquelatinas em plantas sujeitas a contaminação ambiental por mercúrio

A análise quantitativa dos níveis de tióis nas diferentes espécies vegetais revelou que todos os órgãos de todas as espécies estudadas apresentaram fitoquelatinas (Figura IV-2). Estes resultados possuem um carácter inovador na medida em que, até à presente data, são escassos os trabalhos que mostraram a presença de PCs em plantas que colonizam ambientes contaminados por metais (Gawel et al., 2001; Gawel e Hamond, 2004; Figueroa et al., 2007; 2008), sendo a maioria dos estudos realizada em laboratório. No entanto, a sua distribuição quantitativa e qualitativa não foi similar entre os órgãos de cada espécie. Com excepção de *A. patula*, observou-se em todas as espécies uma maior acumulação de fitoquelatinas nas folhas. De um modo geral, a maioria dos trabalhos efectuados, demonstra que há uma maior síntese de fitoquelatinas nas raízes (Arnetoli et al., 2008;

Dharmendra et al., 2002, 2004; Zhang et al., 2005), uma vez que é o órgão onde ocorre a absorção e uma maior acumulação de metais pesados (Lozano-Rodriguez et al., 1997), sendo de imediato activada a produção de fitoquelatinas como principal mecanismo de tolerância. Estes resultados vêm reforçar a importância de analisar a ocorrência de fitoquelatinas em plantas no ambiente, uma vez que se detectaram diferenças relativamente aos estudos efectuados em laboratório.

Analisando o comprimento das cadeias de fitoquelatinas nas várias espécies (Figura IV-3), verificou-se que, de um modo geral, todas as espécies produziram fitoquelatinas de vários tamanhos de cadeia, compreendidas entre  $n=2$  e  $n=4$ . A  $PC_2$  é o péptido que existe em maior quantidade em todos os órgãos de todas as espécies vegetais. Estes resultados estão em concordância com vários trabalhos anteriores (Arnetoli et al., 2008; Dharmendra et al., 2002, 2004; Srivastava et al., 2006) que indicam que a  $PC_2$  está normalmente presente em maiores concentrações. A única excepção ocorre nas raízes de *P. australis*, onde não ocorreram PCs de menor comprimento de cadeia ( $PC_2$ ), podendo a grande acumulação de Hg neste órgão ser a causa para este facto. De acordo com Grill et al. (1987) e Vögelli-Lange e Wagner (1997) a presença de PCs com cadeias mais longas está correlacionada com uma maior acumulação de metal e a uma maior complexação metálica, na medida em que fornece maior estabilidade ao complexo, permitindo a sua retenção no vacúolo.

## **4.2 A relação entre a síntese de PCs e os padrões de acumulação de Hg nas diferentes espécies**

Para compreender se a síntese de fitoquelatinas ocorre em função da acumulação de mercúrio, torna-se necessário comparar os padrões de produção destes agentes quelantes com os padrões de acumulação de Hg nos órgãos das diferentes espécies vegetais estudadas. Vários trabalhos demonstraram que a acumulação de metal nos órgãos é geralmente proporcional à síntese de PCs nesse mesmo órgão (Delhaize et al., 1989; Grill et al., 1987; Hayashi e Nakagawa, 1988; Klapheck et al., 1995; Piechalack et al., 2002; Tukendorf e Rauser, 1990).

Nas dicotiledóneas, a acumulação de Hg foi semelhante entre os 3 órgãos (Tabela II-3), apesar dos órgãos aéreos terem apresentado níveis mais elevados de danos oxidativos

(Figuras III-2 e III-3). Em *A. patula*, a acumulação equitativa de Hg induziu, de facto, uma síntese semelhante de PCs entre os diferentes órgãos. No entanto, a presença de PCs não parece ser um mecanismo suficientemente eficaz na redução da toxicidade do Hg, uma vez que nas folhas desta espécie verificaram-se níveis mais elevados de ROS e também de peroxidação lipídica induzidos por Hg. *H. portulacoides* produziu níveis mais elevados de PCs nas folhas, embora a acumulação de Hg tenha sido igual em todos os órgãos (Tabela II-3), sugerindo que a resposta ao metal é maior neste órgão. Esta maior produção de PCs nas folhas poderá ser a razão pela qual *H. portulacoides* consegue acumular mais Hg do que *A. patula*, experienciando, contudo, níveis menores de stresse oxidativo (Capítulo III).

Nas monocotiledóneas, a acumulação heterogénea de Hg nos seus órgãos deveria induzir uma resposta proporcional ao nível da síntese de PCs. Contudo, tal não se verificou. Contrariamente, os órgãos com maior acumulação de metal foram os que apresentaram menor produção de PCs, observando-se uma relação inversa entre a retenção metálica e a síntese de PCs. Assim, as raízes e rizomas foram os órgãos com menor produção de PCs e simultaneamente maior acumulação de Hg, tendo o contrário sido verificado nos órgãos aéreos. Estes resultados poderão justificar os níveis de stresse oxidativo mais elevados nos órgãos subterrâneos (Figuras III-2 e III-4), dado que havendo níveis baixos de PCs, o Hg livre estará mais disponível para exercer os efeitos tóxicos observados. Curiosamente, e ao comparar o mesmo órgão entre as diferentes espécies, observou-se novamente uma maior acumulação de PCs nos órgãos com menor concentração de Hg. Deste modo, as folhas de *P. australis* são as que acumulam menos metal e as que produzem maiores níveis de PCs, verificando-se o mesmo comportamento nas raízes, em que *A. patula* acumula menos Hg e simultaneamente sintetiza mais PCs. Estes resultados sugerem que, apesar das PCs serem apontadas como o principal mecanismo de tolerância de plantas a metais nas espécies estudadas, a síntese de PCs, particularmente nas monocotiledóneas, não parece ser o principal mecanismo responsável pela tolerância a Hg. Outros autores verificaram também que a produção de PCs não é directamente proporcional à exposição ao metal. Lima et al. (2006) demonstraram que em *P. sativum* o mecanismo de complexação por PCs só é eficiente para concentrações reduzidas de metal e que quanto maior a exposição/concentração de metal, menores os níveis de PCs e menor a sua importância relativa na tolerância. Tal pode dever-se ao seu elevado custo metabólico para a planta, uma vez que a síntese de PCs depende da

glutathiona, que é um péptido de elevada importância para o metabolismo celular, originando uma depleção nos seus níveis intracelulares (May et al., 1998; Mendoza-Cózatl et al., 2005; Tausz et al., 2004).

No entanto, os resultados deste trabalho parecem demonstrar que a concentração mais reduzida de PCs nos órgãos subterrâneos das monocotiledóneas não se deve a uma depleção dos níveis de GSH, uma vez que estes valores se mantiveram sempre muito superiores quando comparados com as PCs (Tabela IV-1). Nos trabalhos realizados *in vitro*, devido à rápida depleção dos níveis de GSH, os valores de PCs totais são sempre superiores aos valores de GSH (Delhaize e Adams, 1989; Grill et al., 1985; Hayashi e Nakagawa, 1988; Lima et al., 2006; Rüegsegger et al., 1990; Tukendorf e Rauser, 1990). Contudo, os resultados deste trabalho apontam para um comportamento inverso. Este é um facto importante porque demonstra, uma vez mais, que em exposições crónicas e ambientais, o mecanismo de tolerância por PCs não se processa da mesma forma relativamente às exposições *in vitro*. Parece ser plausível afirmar que no meio ambiente, as diferentes espécies de plantas mantêm um equilíbrio entre a produção de PCs e a concentração de GSH podendo traduzir-se na estratégia que as plantas adoptaram para manter um equilíbrio metabólico. Sendo assim, estes resultados remetem para um conceito diferente do papel da GSH e PCs em exposições crónicas no meio ambiente, quando comparada com as teorias sugeridas pelos resultados obtidos em laboratório. Este facto reforça a extrema importância de se efectuarem mais trabalhos em condições ambientais. Outros trabalhos recentes salientaram igualmente a importância da GSH em plantas hiperacumuladoras. Sun et al. (2007) realizaram um estudo na planta hiperacumuladora *Sedum alfredii* colhida numa zona de minas contaminadas. Após exposição a cádmio, níveis muito baixos de PCs foram detectados, tendo sido observado um concomitante aumento nos níveis de glutathiona, demonstrando que as PCs não estão envolvidas na tolerância e acumulação de cádmio nesta espécie. O elevado custo metabólico inerente à síntese de PCs poderá justificar o facto de estes péptidos não serem o principal mecanismo de tolerância em plantas hiperacumuladoras (Ebbs et al., 2002; Küpper et al., 2004; Schat et al., 2002).

Um outro facto importante, e que deve ser tido em consideração, é a razão entre as concentrações de GSH e as de PCs (Tabela IV-1), que são mais elevadas nos órgãos subterrâneos das espécies monocotiledóneas, sugerindo que estes órgãos possuem níveis de

GSH suficientes para produzirem uma maior quantidade de PCs, se tal fosse necessário. Estes resultados apontam para a presença de uma estratégia diferente de tolerância ao metal, que parece ser apenas activada em concentrações mais elevadas de Hg, uma vez que tanto em *J. maritimus* como em *P. australis*, os órgãos com menor acumulação de Hg (Tabela II-3) respondem ao metal com uma produção mais elevada de PCs. Deste modo, é possível sugerir que nos órgãos subterrâneos das espécies monocotiledóneas, poderão estar presentes outros mecanismos responsáveis pela grande acumulação de Hg observada.

Outros autores observaram decréscimos na síntese de PCs em plantas sujeitas a exposições contínuas e elevadas de metais (Keltjens e Van Beusichem, 1998; Sneller et al., 1999), contudo não são ainda conhecidas as causas que originam este comportamento. Alguns autores sugeriram que as PCs desempenham apenas uma função transitória na tolerância a metais e que, em elevados níveis de stresse, outros mecanismos poderão ser activados (Leopold et al., 1999; Piechalack et al., 2002; Sanità di Toppi e Gabrielli, 1999), parecendo também aplicar-se ao Hg.

Estudos em plantas hiperacumuladoras de metais que com frequência colonizam solos metalíferos também demonstraram que a sua hipertolerância não está associada a um aumento na síntese de PCs (Ebbs et al., 2002; Küpper et al., 2004; Schat et al., 2002). De Knecht et al. (1995) mostraram que o decréscimo na acumulação de PCs na espécie hipertolerante a zinco, cádmio e cobre, *Silene vulgaris*, pode resultar de mecanismos de sequestração alternativos às fitoquelatinas, diminuindo os níveis de metal no citoplasma, necessários à activação da PC sintetase. No entanto, um trabalho recente de Válega et al. (2009) em espécimes adultos de *H. portulacoides* colhidos em locais com elevada contaminação por mercúrio, apresentou a separação dos complexos péptido-Hg. Este estudo revelou que, apesar de uma fracção do Hg estar associado a PCs, a sua maioria estava associado a um pico proteico desconhecido de maior peso molecular, que provavelmente será o agente quelante responsável pela tolerância ao Hg. Os autores sugerem também que estas moléculas poderão ser metalotioninas ou mesmo ácidos orgânicos. Assim, é possível que nos órgãos subterrâneos das monocotiledóneas, a presença de metalotioninas permita uma complexação imediata dos iões de Hg. Com a imediata quelação dos iões de Hg, a PC sintetase seria fracamente activada, o que justificaria a reduzida quantidade de PCs nestes órgãos. Se estes mecanismos forem apenas activados na presença de elevadas concentrações de metal, então nas folhas, que possuem



uma menor concentração de Hg, eles não estariam activos. Consequentemente, a presença de metal livre activaria a enzima PC sintetase, originando uma maior acumulação de PCs nestes órgãos.

#### 4.4 Conclusões gerais

Os resultados obtidos neste capítulo fornecem evidências importantes relativamente ao papel das fitoquelatinas na acumulação e na tolerância a mercúrio em plantas de sapal provenientes de locais contaminados com este metal. Apesar da exposição ao Hg ter induzido a síntese de PCs nos vários órgãos das plantas, o seu papel na tolerância revelou-se mais complexo comparativamente ao que tem vindo a ser observado nos estudos efectuados em laboratório.

Em primeiro lugar, e contrariamente ao observado na maioria dos trabalhos efectuados em laboratório, observou-se que os níveis de glutathione são superiores aos níveis de fitoquelatinas. Esta evidência sugere uma estratégia das plantas no meio ambiente para manterem um equilíbrio metabólico e simultaneamente tolerarem mercúrio. Em segundo lugar, nas espécies monocotiledóneas, o órgão com maior acumulação de mercúrio é também aquele que apresenta menor conteúdo em fitoquelatinas, sugerindo que, no meio ambiente, com exposições crónicas e elevadas, em algumas espécies, a síntese de fitoquelatinas não parece ser o principal mecanismo de tolerância a este metal, podendo entrar em acção outros mecanismos de tolerância complementares. Contudo, nos tecidos com menor acumulação de Hg, como é o caso das folhas das monocotiledóneas e das espécies dicotiledóneas, as PCs parecem, ser de facto, a resposta principal à presença de Hg. No caso das folhas de *H. portulacoides* este mecanismo parece ser inclusivamente responsável pela maior tolerância apresentada por esta espécie, que comparativamente à outra dicotiledónea, *A. patula*, acumula níveis mais elevados de Hg nos seus órgãos, apresentando menos danos oxidativos.

## **Capítulo V**

### **Conclusões finais e Perspectivas para trabalho futuro**

---

Nos últimos anos, devido à elevada contaminação de vários ecossistemas, tem existido um interesse contínuo em descobrir plantas nativas hiperacumuladoras de metais. Contudo, poucos estudos avaliaram o potencial de fitorremediação destas plantas em condições ambientais. No caso de zonas estuarinas contaminadas por Hg, a identificação de espécies halófitas tolerantes a este metal, para fitorremediar estas zonas torna-se extremamente importante.

Este trabalho demonstrou a importância do estudo de mecanismos de resposta em plantas de sapal após exposição ambiental a mercúrio e o impacto que podem ter na descontaminação de áreas de sapal contaminadas por este metal. Um maior conhecimento sobre a acumulação de Hg em espécies representativas de sapais e sobre o seu papel na mobilidade do metal no ecossistema, bem como sobre os mecanismos moleculares subjacentes à tolerância a mercúrio são importantes para promover a utilização destas espécies em estratégias de fitorremediação.

Deste modo, este trabalho teve como principais objectivos (1) a avaliação da acumulação de Hg nos órgãos de quatro espécies diferentes de halófitas que colonizam um sapal contaminado por este metal e inferir sobre o seu potencial de fitorremediação; (2) a avaliação de vários mecanismos subjacentes à tolerância a este metal, tais como a imobilização do metal nas paredes celulares; a presença de efeitos tóxicos, nomeadamente danos oxidativos e a subsequente resposta antioxidante e a síntese de fitoquelatinas como mecanismo de sequestração intracelular do metal.

O presente trabalho demonstrou que todas as espécies absorveram quantidades reduzidas de Hg, quando comparadas com a concentração de metal nos respectivos sedimentos. Este facto parece indicar que todas as espécies lidam de modo semelhante com a elevada exposição a mercúrio, evitando a sua absorção, podendo este comportamento ser a base da tolerância destas plantas face à elevada toxicidade deste metal, ou devido à sua reduzida biodisponibilidade.

A acumulação de mercúrio nas plantas revelou diferenças de comportamento entre os dois grupos de plantas: dicotiledóneas e monocotiledóneas. *A. patula* e *H. portulacoides* apresentaram níveis de mercúrio semelhantes nas folhas, caules e raízes, enquanto que *J. maritimus* e *P. australis* acumularam níveis de mercúrio bastante mais elevados nos órgãos subterrâneos em comparação com os seus órgãos aéreos. Estas diferenças de acumulação podem dever-se às diferentes estratégias que estes dois grupos possuem para lidar com o metal.

As diferenças de acumulação de mercúrio observadas entre as espécies estudadas têm repercussões na mobilidade do metal no sapal e ditam o potencial de fitorremediação de cada uma das espécies. Assim, as monocotiledóneas parecem ter uma maior capacidade em estabilizar o Hg, retendo-o nas zonas subterrâneas (sedimentos e órgãos subterrâneos), reduzindo a dispersão do metal para o restante ecossistema. Por outro lado, *H. portulacoides*; *J. maritimus* e *P. australis* apresentaram uma maior acumulação de Hg nos órgãos aéreos por unidade de área, podendo originar um aumento da disponibilidade de Hg para a cadeia alimentar e consequentemente levar ao transporte do metal para fora do sistema. Considerando a perspectiva de fitorremediação, *J. maritimus* e *P. australis* parecem as melhores candidatas para fitoestabilizar o mercúrio, enquanto que em termos de fitoextração todas as espécies, com excepção de *A. patula*, apresentam potencial semelhante.

Embora se tenham verificado diferenças importantes entre as várias espécies estudadas, a estratégia geral que todas adoptaram para lidar com elevadas exposições ambientais de Hg foi a imobilização do metal na fracção insolúvel, ou seja, maioritariamente nas paredes celulares. Esta acumulação preferencial do metal parece representar um mecanismo de protecção contra o mercúrio em plantas que habitam ambientes contaminados, sugerindo um esforço em manter o Hg fora da célula, impedindo o aumento do metal no citosol e consequentemente a sua toxicidade.

Em relação aos mecanismos envolvidos na tolerância ao mercúrio, foi demonstrado que após exposição ambiental ao metal, todas as espécies apresentaram sintomas de stresse oxidativo. Os resultados obtidos demonstram que o mercúrio, de um modo geral, parece estar associado a elevados níveis de ROS e consequentemente de danos oxidativos nas espécies estudadas. No entanto, ao comparar as diferentes espécies vegetais, conclui-se que *A. patula* é a espécie que se encontra em maior stresse oxidativo induzido por mercúrio comparativamente às restantes espécies, particularmente *J. maritimus* e *P. australis*. Estas diferenças de danos oxidativos entre as espécies deveram-se, provavelmente, à acção das enzimas antioxidantes. As dicotiledóneas apresentam, particularmente nas folhas, níveis mais baixos de actividade de todas as enzimas antioxidantes, possivelmente devido à acção directa do mercúrio. Contariamente, as monocotiledóneas apresentam valores mais elevados de GPx nos órgãos subterrâneos, tendo-se verificado na raiz de *P. australis* níveis mais elevados de actividade da SOD, induzidas provavelmente pela maior acumulação de Hg neste órgão.

A importância de agentes quelantes, nomeadamente fitoquelatinas, na acumulação de mercúrio nestas espécies foi igualmente demonstrada. Contudo, os resultados obtidos parecem indicar que este mecanismo se processa de um modo muito diferente do observado em outros trabalhos de laboratório. Em todas as espécies, os níveis de glutathione apresentaram-se sempre superiores aos níveis de fitoquelatinas. Esta evidência poderá traduzir-se na estratégia que as plantas no meio ambiente adoptaram para manter um equilíbrio metabólico e simultaneamente tolerarem mercúrio. Este trabalho demonstrou também que todas as espécies produziram fitoquelatinas face à exposição ambiental a mercúrio, havendo diferenças entre as espécies dicotiledóneas e monocotiledóneas. Nas dicotiledóneas e nos órgãos aéreos das monocotiledóneas a síntese de PCs foi, de facto, a principal resposta à presença de Hg. Contudo, nas espécies monocotiledóneas, o órgão com maior acumulação de mercúrio foi aquele que apresentou menor conteúdo em fitoquelatinas, sugerindo que, no meio ambiente, em exposições crónicas e elevadas, a síntese de fitoquelatinas não parece ser o principal mecanismo de tolerância a mercúrio, podendo entrar em acção outros mecanismos de tolerância complementares.

Os dados apresentados nesta tese contribuem certamente para uma melhor compreensão das estratégias adoptadas por plantas de sapal face à exposição a uma elevada contaminação ambiental por mercúrio. Considerando que a maioria das espécies vegetais usadas em processos de fitorremediação não conseguem sobreviver neste tipo de ambientes, o uso de espécies endémicas facilitará a descontaminação de sapais.

No entanto, este trabalho não culmina apenas em respostas, havendo questões que permanecem inevitavelmente por responder. Assim, em trabalhos futuros será importante direccionar o trabalho no sentido de:

Concluir acerca da eventual capacidade de absorção foliar de mercúrio nestas plantas;

Dada a elevada quantidade de mercúrio presente na fracção insolúvel dos ógãos vegetais, perceber quais os constituintes da parede celular a que o metal se liga nestas espécies;

Averiguar o papel de outros agentes quelantes na tolerância a mercúrio, nomeadamente metalotioninas e ácidos orgânicos;

Este estudo poderá ser um ponto de partida para a realização de mais trabalhos nomeadamente em outros sapais, noutras espécies e com outros metais. Compreendendo quais os mecanismos inerentes à tolerância a metais pesados em plantas de sapal, será possível a manipulação dessas características de modo a otimizar a aplicação destas plantas em processos de fitorremediação.

---

# Bibliografia

---

**Adam, P** (1990) Saltmarsh ecology. Cambridge University Press, Cambridge

**Ali MB, Vajpayee P, Tripathi RD, Rai UN, Kumar A, Singh N** (2000) Mercury bioaccumulation induces oxidative stress and toxicity to submerged macrophyte *Potamogeton crispus* L. Environ Cont Toxicol **65**: 573-582

**Allen JRL, Pye K** (1992) Salmarshes. Cambridge Universiy Press. 184 pp

**Almeida CMR, Mucha AP, Vasconcelos MTSD** (2006) Comparison of the role of the sea club-rush *S. maritimus* and the sea rush *J. maritimus* in terms of concentration, speciation and bioaccumulation of metals in the estuarine sediment. Environ Pollut **142**: 151-159

**Alongi DM, Ley JA** (1997) Marine Biological Communities and Processes of the Western Gulf of Papua: a Review with Assessment of Potential Impacts of a Proposed Gas Pipeline. 75p

**Alscher RG, Erturk N, Heath LS** (2002) Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. J Exp Bot **53**: 1331–1341

**Anexo nº 4 do artigo 6.º**, Despacho conjunto dos Ministérios do Ambiente e Recursos Naturais e do Mar. Diário da República – II Série Nº **141** de 21/06/1995: 6805-6807

**Angela M, Farida M, Richard B, Sabine L** (2004) Possible functions of extracellular peroxidases in stress-induced generation and detoxification of active oxygen species. Phytochem Rev **3**: 173-193

**Apel K, Hirt H** (2004) Reactive oxygen species: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. Annu Rev Plant Biol **55**: 373-99

**Arnetoli M, Vooijs R, Bookum W, Galardi F, Gonnelli C, Gabbrielli R, Schat H, Verkleij JAC** (2008) Arsenate tolerance in *Silene paradoxa* does not rely on phytochelatins-dependent sequestration. Environ Pollut **152**: 585-591

**Asada K, Takahashi M** (1987) Production and scavenging of active oxygen in photosynthesis. In: Kyle, DJ *et al.*, (eds.), Photoinhibition. Elsevier, pp 227–287

- Asada K** (1999) The water–water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygen and dissipation of excess photons. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **50**: 601–639
- Badawi GH, Yamauchi Y, Shimada E, Sasaki R, Naoyoshi K, Tanaka K, Tanaka K** (2004) Enhanced tolerance to salt stress and water deficit by overexpressing superoxide dismutase in tobacco (*Nicotiana tabacum*) chloroplasts. *Plant Sci* **166**: 919–28
- Baker AJM** (1981) Accumulators and excluders – strategies in the response of plants to heavy metals. *J Plant Nutr* **3**: 643–654
- Beauchamp C, Fridovich I** (1971) Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal Biochem* **44**: 276–287
- Beefink WG, Nieuwenhuize J, Stoeppler M, Mohl C** (1982) Heavy metal accumulation in salt marshes from the Western and Eastern Scheldt. *Sci Total Environ* **25**: 199–223
- Bennetzen JL, Adams TL** (1984) Selection and characterization of cadmium-resistant suspension cultures of the wild tomato, *Lycopersicon peruvianum*. *Plant Cell Rep* **3**: 258–261
- Bernier M, Carpentier R** (1995) The action of mercury on the binding of the extrinsic polypeptides associated with the water oxidizing complex of Photosystem II. *FEBS Lett* **360**: 251–254
- Bernier M, Popovic R, Carpentier R** (1993) Mercury inhibition at the donor side of Photosystem II is reversed by chloride. *FEBS Lett* **321**: 19–23
- Bizily SP, Rugh CL, Summers AO, Meagher RB** (1999) Phytoremediation of methylmercury pollution: merB expression in *Arabidopsis thaliana* confers resistance to organomercurials. *PNAS* **96**: 6808–6813
- Boening DW** (2000) Ecological effects, transport and fate of mercury: A general review. *Chemosphere* **40**: 1335–1351
- Bowler C, Van Montagu M, Inzé D** (1992) Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **43**: 83–116
- Bradford MM** (1976) A rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal Biochem* **72**: 248–254
- Burke DJ, Weis JS, Weis P** (2000) Release of Metals by the Leaves of the Salt Marsh Grasses *Spartina alterniflora* and *Phragmites australis*. *Est Coastal Shelf Sci* **51**: 153–159
- Caçador MI** (1994) Acumulação e retenção de metais pesados nos sapais do estuário do Tejo. Dissertação de Doutoramento. Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa

- Caçador MI, Vale C, Catarino F** (1996) Accumulation of Zn, Pb, Cu, Cr and Ni in sediments between roots of the Tagus estuary salt marshes, Portugal. *Est Coast Shelf Sci* **42**: 393 - 403
- Caçador MI, Vale C, Catarino F** (2000) Seasonal variation of Zn, Pb, Cu and Cd concentrations in the root-system of *Spartina maritima* and *Halimione portulacoides* from Tagus estuary salt marshes. *Mar Environ Res* **49**: 279-290
- Capiomont A, Piazzzi L, Pergent G** (2000) Seasonal variations of total mercury in foliar tissues of *Posidonia oceanica*. *J Mar Biol Assoc UK* **80**: 1119–1123
- Carbonell MA, Aarabi M, DeLaune RD, Gambrell RP, Patrick Jr WH** (1998) Bioavailability and uptake of arsenic by wetland vegetation: effects on plant growth and nutrition. *J Environ Sci Health A* **33**: 45-66
- Cargnelutti D, Tabaldi LA, Spanevello RM, Jucoski GO, Battisti V, Redin M, Linares CEB, Dressler VL, Flores ÉMM, Nicoloso FT, Morsch VM, Schetinger MRC** (2006) Mercury toxicity induces oxidative stress in growing cucumber seedlings. *Chemosphere* **65**: 999-1006
- Carrier P, Baryla A, Havaux M** (2003) Cadmium distribution and microlocalization in oilseed rape (*Brassica napus*) after long-term growth on cadmium-contaminated soil. *Planta* **216**: 939–950
- Cavallini A, Natali L, Durante M, Maserti B** (1999) Mercury uptake, distribution and DNA affinity in durum wheat (*Triticum durum* Desf) plants. *Sci Total Environ* **243/244**: 119-127
- Chaudiere J, Ferrari-Iliou R** (1999) Intracellular antioxidants: from chemical to biochemical mechanisms. *Food Chem Toxicol* **37**: 949-962
- Chen J, Zhou J, Goldsbrough PB** (1997) Characterization of phytochelatin synthase from tomato. *Physiol Plant* **101**: 165–172
- Chen J, Safwan S, Han FX, Monts DL, Waggoner CA, Yang Z, Su Y** (2009) Bioaccumulation and physiological effects of mercury in *Pteris vittata* and *Nephrolepis exaltata*. *Ecotoxicol* **18**: 110-121
- Chenhall BE, Yassini, I, Jones, BG** (1992) Heavy metal concentrations in lagoonal salt marsh species, Illawarra region, Sothern Australia. *Sci Total Environ* **125**: 203-225
- Cho UH, Park JO** (2000) Mercury-induced oxidative stress in tomato seedlings. *Plant Sci* **156**: 1-9
- Clarkson TW** (2002) The Three Modern Faces of Mercury. *Environ Health Perspect* **110** (1): 11-23
- Clemens S** (2001) Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis. *Planta* **212**: 475-86



**Clijsters H, Van Assche F** (1985) Inhibition of photosynthesis by heavy metals. *Photosynth Res* **7**: 31–40

**Cobbett CS, May MJ, Howden R, Rolls B** (1998) The glutathione-deficient, cadmium-sensitive mutant, *cad2-1*, of *Arabidopsis thaliana* is deficient in g-glutamylcysteine synthetase. *Plant J* **16**: 73–78

**Cobbett CS** (2000) Phytochelatin biosynthesis and function in heavy metal detoxification. *Curr Opin Plant Biol* **3**: 211–216

**Cobbett CS, Goldsbrough P** (2002) Phytochelatins and methalothioneins: Roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Ann Rev Plant Biol* **53**:159–182

**Cooper A** (1982) The effects of salinity and waterlogging on the growth and cation uptake of salt marsh plants. *New Phytologist* **90**: 263–275

**Coquery M, Welbourn PM** (1994) Mercury uptake from contaminated water and sediment by the rooted and submerged aquatic macrophyte *Eriocaulon septangulare*. *Arch Environ Cont Toxicol* **26**: 335–341

**Crowder A** (1991) Acidification, metals and macrophytes. *Environ Pollut* **71**: 171–203

**Dameron CT, Reese RN, Mehra RK, Kortan AR, Carroll PJ, Steigerwald ML, Brus LE, Winge DR** (1989) Biosynthesis of cadmium sulphide quantum semiconductor crystallites. *Nature* **338**: 596–597

**Dat J, Vandenabeele S, Vranová E, Van Montagu M, Inzé D, Van Breusegem F** (2000) Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cell Mol Life Sci* **57**: 779–795

**De Knecht JA, Van Dillen M, Koevoets PLM, Schat H, Verkleij JAC, Ernst WHO** (1994) Phytochelatins in cadmium-sensitive and cadmium-tolerant *Silene vulgaris*: chain length distribution and sulphide incorporation. *Plant Physiol* **104**: 255–261

**De Knecht JA, Van Baren N, ten Bookum WM, Wong Fong Sang HW, Koevoets PLM, Schat H, Verkleij JAC** (1995) Synthesis and degradation of phytochelatins in cadmiumsensitive and cadmium-tolerant *Silene vulgaris*. *Plant Sci* **106**: 9–18

**Del Rio LA, Sandalio LM, Corpas FJ, Palma JM, Barroso JB** (2006) Reactive oxygen species and reactive nitrogen species in peroxisomes. Production, scavenging, and role in cell signaling. *Plant Physiol* **141**: 330–35

**Delhaize E, Adams TL** (1989) Poly(-glutamylcysteinyl)glycine synthesis in *Datura innoxia* and binding of cadmium. *Plant Physiol* **89**: 700–706

**Dharmendra KG, Tohoyama H, Joho M, Inouhe M** (2002) Possible roles of phytochelatins and glutathione metabolism in cadmium tolerance in chickpea roots. *J Plant Res* **115**: 429–437

**Dharmendra KG, Tohoyama H, Joho M, Inouhe M** (2004) Changes in the levels of phytochelatins and related metal-binding peptides in chickpea seedlings exposed to arsenic and different heavy metal ions. *J Plant Res* **117**: 253–256

**Dorgelo J, Meester H, Van Velzen C** (1995) Effects of diet and heavy metals on growth rate and fertility in the deposit-feeding snail *Potamopyrgus jenkinsi* (Smith) (*Gastropoda: Hydrobiidae*). *Hydrobiologia* **316**: 199–210

**Doyle MO, Otte ML** (1997) Organism-induced accumulation of Fe, Zn and As in wetland soils. *Environ Pollut* **96** (1): 1-11

**Dushenkov V, Kumar PBAN, Motto H, Raskin I** (1995) Rhizofiltration the use of plants to remove heavy metals from aqueous streams. *Environ Sci Technol* **29**: 1239-1245

**Ebbs S, Lau I, Ahner B, Kochian L** (2002) Phytochelatin synthesis is not responsible for Cd tolerance in the Zn/Cd hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* (J. & C. Presl). *Planta* **214**: 635-640

**Elstner EF** (1990) *Der Sauerstoff: Biochemie, Biologie, Medizin*. Wissenschaftsverlag, Mannheim

**Ernst WHO** (1990) Ecophysiology of plants in waterlogged and flooded environments. *Aquat Bot* **38**: 73–90

**Ernst WHO, Verkleij JAC, Schat H** (1992) Metal tolerance in plants. *Acta Bot Neerl* **41**: 229-248

**Escobar A, Rubio MA, Lissi EA** (1996) SOD and catalase inactivation by singlet oxygen and peroxy radicals. *Free Rad Biol Med* **20**: 285-290

**Esteban E, Morena E, Pénalosa J, Cabrero JI, Millán M, Zornoza P** (2008) Short and long-term uptake of Hg in white lupin plants: Kinetics and stress indicators. *Environ Exp Bot* **62**: 316–322

**Ferrat L, Romeo M, Gnassia-Barelli M, Pergent-Martini, C** (2002) Effects of mercury on antioxidant mechanisms in the marine phanerogam *Posidonia oceanica*. *Dis Aquat Org* **50**: 157–160

**Figueroa JLA, Afton S, Wrobel K, Wrobel K, Caruso JA** (2007) Analysis of phytochelatins in nopal (*Opuntia ficus*): a metallomics approach in the soil–plant system. *J Anal Atom Spectr* **22**: 845–1008

**Figueroa JAL, Wrobel K, Afton S, Caruso JA, Corona JFG, Wrobel K** (2008) Effect of some heavy metals and soil humic substances on the phytochelatin production in wild plants from silver mine areas of Guanajuato, Mexico. *Chemosphere* **70**: 2084-2091

**Fitzgerald EJ, Caffrey JM, Nesaratnam ST, McLoughlin P** (2003) Copper and lead concentrations in salt marsh plants on the Suir Estuary, Ireland. *Environ Pollut* **123**: 67-74

**Foyer CH, Furbank RT, Harbinson J, Horton P** (1990) The mechanisms contributing to photosynthetic control of electron transport by carbon assimilation in leaves *Photosynth Res* **25**: 83–100

**Foyer CH** (1993) Ascorbic acid. In: Alscher RG, Hess JL (eds), *Antioxidants in Higher Plants*, CRC Press, Boca Raton, FL, pp 31–58

**Foyer CH, Lopez-Delgado H, Dat JF, Scott IM** (1997) Hydrogen peroxide- and glutathione-associated mechanisms of acclimatory stress tolerance and signalling. *Physiol Plant* **100**: 241–254

**Foyer CH, Harbinson J** (1994) Oxygen metabolism and the regulation of photosynthetic electron transport. In: Foyer CH, Mullineaux PM, (eds.), *Causes of Photooxidative Stress and Amelioration of Defense Systems in Plants*. CRC Press, London, UK, pp 1-42

**Foyer CH, Noctor G** (2003) Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. *Physiol Plant* **119**: 355–364

**Franco JA** (1971) *Nova Flora de Portugal*. Vol I. Lisboa

**Gallego S, Benavides M, Tomaro M** (2002) Involvement of an antioxidant defense system in the adaptative response to heavy metal ions in *Helianthus annuus* L. cells. *Plant Growth Regul* **36**: 267-273

**Gambrell RP** (1994) Trace and toxic metals in wetlands-a review. *J Environ Qual* **23**: 883-891

**Garçon G, Dagher Z, Zerimech F, Ledoux F, Courcot D, Aboukais A, Puskarić E, Shirali P** (2006) Dunkerque city air pollution particulate matter-induced cytotoxicity, oxidative stress and inflammation in human epithelial lung cells (L132) in culture. *Toxicol In Vitro* **20**: 519-528

**Gaur JP, Rai LC** (2001) Heavy metal tolerance in algae. In: Rai LC, Gaur JP (eds.), *Algal Adaptation to Environmental Stresses: Physiological, Biochemical and Molecular Mechanisms*. Springer-Verlag, Berlin, pp 363–388

**Gawel JE, Trick CG, Morel FMM** (2001) Phytochelatins are bioindicators of atmospheric metal exposure via direct foliar uptake in trees near Sudbury, Ontario, Canada. *Environ Sci Technol* **35**: 2108–2113

**Gawel JE, Hemond HF** (2004) Biomonitoring for metal contamination near two Superfund sites in Woburn, Massachusetts, using phytochelatins. *Environ Pollut* **131**: 125–135

- Ghezzi P, Bonetto V** (2003) Redox proteomics: identification of oxidatively modified proteins. *Proteomics* **3**: 1145-1153
- Giblin AE, Luther GW, Valiela I** (1986) Trace metal solubility in salt marsh sediments contaminated with sewage sludge. *Est Coast Shelf Sci* **23**: 477-498
- Glimour JT, Miller MS** (1973) Fate of a mercuric-mercurous chloride fungicide added to turfgrass. *J Env Qual* **2**: 145-148
- Godbold DL** (1991) Mercury induced root damage in spruce seedlings. *Water Air Soil Pollut* **56**: 823-831
- Godbold DL, Hüttermann A** (1988) Inhibition of photosynthesis and transpiration in relation to mercury-induced root damage in spruce seedlings. *Physiol Plant* **74**: 270-275
- Goldberg ED, Gamble E, Griffin JJ, Koide M** (1977) Pollution history of Narragansett Bay as recorded in sediments. *Est Coast Sci* **5**: 549-561
- Goldsbrough P** (2000) Metal tolerance in plants: the role of phytochelatin and metallothioneins. In: Terry N, Banuelos G (eds.), *Phytoremediation of Contaminated Soil and Water*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp 221-233
- Goren R, Siegel SM** (1976) Mercury-induced ethylene formation and abscission in *Citrus* and *Coleus* explants. *Plant Physiol* **57**: 628-31
- Gratão PL, Polle A, Lea P, Azevedo R** (2005) Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. *Funct Plant Biol* **32**: 481-494
- Greger M** (1999) Metal availability and bioconcentration in plants. In: Prasad MNV, Hagemeyer J (eds.), *Heavy metal stress in plants: From Molecules to Ecosystems*. Springer-verlag, Heidelberg, Berlin, Germany, pp 1-27
- Grill E, Winnacker E-L, Zenk MH** (1985) Phytochelatin: the principal heavy-metal complexing peptides of higher plants. *Science* **230**: 674-676
- Grill RN, Winnacker EL, Zenk MH** (1986) Synthesis of seven different homologous phytochelatin in metal exposed *Schizosaccharomyces pombe* cells. *FEBS Lett* **197**: 115-119
- Grill E, Winnacker EL, Zenk MH** (1987) Phytochelatin, a class of heavy-metal-binding peptides from plants are functionally analogous to metallothioneins. *PNAS* **84**: 439-443
- Grill E, Löffler S, Winnacker E-L, Zenk MH** (1989) Phytochelatin, the heavy-metal binding peptides of plants, are synthesised from glutathione by a specific -glutamylcysteine dipeptidyl transpeptidase (phytochelatin synthase). *PNAS* **86**: 6838-6842

**Guerzoni S, Frigani M, Giordani P, Frascari F** (1984) Heavy metals in sediments from different environments of a Northern Adriatic Sea area, Italy. *Environ Geol Wat Sci* **6**: 111-119

**Gupta M, Tripathi RD, Rai UN, Chandra P** (1998) Role of glutathione and phytochelatin in *Hydrilla verticillata* (L. f.) Royle and *Vallisneria spiralis* under mercury stress. *Chemosphere* **37**: 785–800

**Gussarson M, Asp H, Adalsteinsson S, Jensén P** (1996) Enhancement of cadmium effects on growth and nutrient composition of birch (*Betula pendulata*) by buthionine sulfoximine (BSO). *J Exp Bot* **47**: 211–215

**Ha S-B, Smith AP, Howden R, Dietrich WM, Bugg S, O'Connell MJ, Goldsbrough PB, Cobbett CS** (1999) Phytochelatin synthase genes from *Arabidopsis* and the yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Plant Cell* **11**: 1153–1163

**Hagenmeyer J, Waisel Y** (1988) Excretion of ions (Cd<sup>2+</sup>, Li<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, and Cl<sup>-</sup>) by *Tamarix aphylla*. *Physiol Plant* **73**: 541-546

**Hall B** (1985) The gas phase oxidation of elemental mercury by ozone. *Wat Air Soil Pollut* **80**: 301-315

**Hall EJ** (2000) Radiology for Radiologists. Lippincot Williams and Wilkins, Philadelphia

**Hall JL** (2002) Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *J Exp Bot* **53**: 1-11

**Halliwell B, Gutteridge JMC** (1984) Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J* **219**: 1-14

**Halliwell B, Gutteridge JMC** (1999) Free Radicals in Biology and Medicine. Oxford Univ. Press. 3rd ed

**Hammond-Kosack KE, Jones JDG** (1996) Resistance gene-dependent plant defense responses. *Plant Cell* **8**: 1773–1791

**Hart BT** (1982) Uptake of trace metals by sediments and suspended particulates: a review. *Hydrobiologia* **91**: 299-313

**Harter RD** (1983) Effect of soil pH on adsorption of lead, copper, zinc, and nickel. *Soil Sci Soc Am J* **47**: 47-51

**Hartley-Whitaker J, Woods C, Meharg AA** (2002) Is differential phytochelatin production related to decreased arsenate influx in arsenate tolerant *Holcus lanatus*? *New Phytol* **155**: 219-225

**Hausladen A, Alscher R** (1994) Purification and characterization of glutathione reductase isozymes specific for the state of cold hardiness of red spruce. *Plant Physiol* **105**: 205-213

**Hayashi Y, Nakagawa CW** (1988) The change in cadystin components in Cd-binding peptides from the fission yeast during their induction by cadmium. *Biochem Cell Biol* **66**: 268-274

**Hess JL** (1993) Vitamin E, alpha-tocopherol. In: Alscher RG, Hess JL (eds) *Antioxidants in Higher Plants*. CRC Press, Boca Raton, pp 111-134

**Hippeli S, Heiser I, Elstner EF** (1999) Activated oxygen and free oxygen radicals in pathology: new insights and analogies between animals and plants. *Plant Physiol Biochem* **37**: 167-178

**Hitchcock AE, Zimmermann PW** (1957) Toxic effects of vapors of mercury and of compounds of mercury on plants. *Ann N Y Acad Sci* **65**: 474-497

**Horvat M, Covelli S, Faganelli J, Logar M, Maudic V, Rajar R, Sirca A. and Zagar D** (1999) Mercury in contaminated coastal environments; a case study: the Gulf of Trieste. *Sci Total Env* **237/238**: 43-56

**Howden R, Cobbett CS** (1992) Cadmium-Sensitive Mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* **100**: 100-107

**Howden R, Goldsbrough PB, Andersen CR, Cobbett CS** (1995) Cadmium-sensitive, *cad1* mutants of *Arabidopsis thaliana* are phytochelatin deficient. *Plant Physiol* **107**: 1059-1066

**Hung GA, Chmura GL** (2006) Mercury accumulation in surface sediments of salt marshes of the Bay of Fundy. *Environ Pollut* **142**: 418-431

**Israr M, Sahi S** (2006) Antioxidant response to mercury in the cell cultures of *Sesbania drummondii*. *Plant Physiol Biochem* **44**: 590-595

**Israr M, Sahi S, Datta R, Sarkar D** (2006) Bioaccumulation and physiological effects of mercury in *Sesbania drummondii*. *Chemosphere* **65**: 591-598

**Jackson LJ** (1998) Paradigms of metal accumulation in rooted aquatic vascular plants. *Sci Total Environ* **219**: 223-331

**Jacob DL, Otte ML** (2003) Conflicting processes in the wetland plant rhizosphere: metal retention or mobilization? *Water Air Soil Pollut* **3**: 91-104

**Jing YD, He ZL, Yang XE** (2007) Effects of pH, organic acids, and competitive cation on mercury desorption in soils. *Chemosphere* **69**: 1662-1669

**Johansson LH, Borg LAH** (1988) A spectrophotometric method for determination of catalase activity in small tissue samples. *Anal Biochem* **174**: 331-336

**Kabata-Pendias A, Pendias H** (1984) Trace elements in soils and plants. Boca Raton: CRC Press 315 p

**Kanerva T, Sarin O, Nuorteva P** (1988) Aluminium, iron, zinc, cadmium and mercury in some indicator plants growing in south Finnish forest areas with different degrees of damage. *Ann Bot Fenn* **25**: 275–279

**Ke DS, Wang AG, Sun GC, Dong LF** (2002) The effect of active oxygen on the activity of ACC synthase induced by exogenous IAA. *Acta Bot Sin* **44**: 551–556

**Keller P, Deuel H** (1957) Kationenaustauschkapazität und Pektingehalt von Pflanzenwurzeln. *Z Pflanzenernähr Düng Bodenkd* **79**: 179–181

**Kiekens L** (1995) Zinc. In: Alloway BJ (ed.), *Heavy Metals in Soils*. Blackie Academic and Professional, London, pp 284–305

**Klapheck S, Chrost B, Starke J, Zimmermann H** (1992) Glutamylcysteinylserine: a new homologue of glutathione in plants of the family Poaceae. *Bot Acta* **105**: 174–179

**Klapheck S, Fliegner W, Zimmer I** (1994) Hydroxymethylphytochelatins [(γ-glutamylcysteine)n-serine] are metalinduced peptides of the Poaceae. *Plant Physiol* **104**: 1325–1332

**Klapheck S, Schlun, S, Bergman L** (1995) Synthesis of phytochelatins and homophytochelatins in *Pisum sativum* L. *Plant Physiol* **107**: 515–521

**Klapheck, S** (1988) Homoglutathione: isolation, quantification and occurrence in legumes. *Physiol Plant* **74**: 727–732

**Kneer R, Zenk MH** (1992) Phytochelatins protect plant enzymes from heavy metal poisoning. *Phytochemistry* **31**: 2663–2667

**Kneer R, Zenk MH** (1997) The formation of Cd-phytochelatin complexes in plant cell cultures. *Phytochemistry* **44**: 69–74

**Krupa Z, Baszynski T** (1995) Some Aspects of Heavy Metals Toxicity Towards Photosynthetic Apparatus—Direct and Indirect Effects on Light and Dark Reactions. *Physiol Plant* **17**: 177–190

**Kuhlmeier PD** (1991) Occurrence and distribution of tributyltin in a coastal wetland in Northern California. *Hydrol. Basis Ecol. Sound Manage. Soil GroundWater*, IAHS Publ. **202**: 315–324

**Kumar PBAN, Dushenkov V, Motto H, Raskin I** (1995). Phytoextraction the use of plants to remove heavy metals from soils. *Environ Sci Technol* **29**: 1232–1238

**Küpper H, Mijovilovich A, Meyer-Klaucke W, Kroneck PMH** (2004) Tissue- and Age-Dependent Differences in the Complexation of Cadmium and Zinc in the

Cadmium/Zinc Hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* (Ganges Ecotype) Revealed by X-Ray Absorption Spectroscopy. *Plant Physiol* **134**: 748-757

**Lacerda LD, Freixo JL, Coelho SM** (1997) The effect of *Spartina alterniflora* Loisel on trace metals accumulation in inter-tidal sediments. *Mangr Salt Marsh* **1**: 201-209

**Lasat M** (2002) Phytoextraction of toxic metals: a review of biological mechanisms. *J Environ Qual* **31**: 109-120

**Leita L, De Nobili M, Cesco S, Mondini C** (1996) Analysis of intercellular cadmium forms in roots and leaves of bush bean. *J Plant Nutr* **19**: 527-533

**Lenka M, Panda KK, Panda BB** (1992) Monitoring and assessment of mercury pollution in the vicinity of a chloralkali plant. 4. Bioconcentration of mercury in in situ aquatic and terrestrial plants at Ganjam, India. *Arch Environ Cont Toxicol* **22**: 195-202

**Leopold I, Gunther D, Schmit J, Neumann D** (1999) Phytochelatins and heavy metal tolerance. *Phytochem* **50**: 1323-1328

**Levine RL, Willians JA, Stadtman ER, Shacter E** (1994) Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Meth Enzymol* **233**: 346-363

**Levine A, Tenhaken R, Dixon R and Lamb C** (1994) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell* **79**: 583-593

**Liang Y, Wong MH** (2003) Spatial and temporal organic and heavy metal pollution at Mai Po Marshes Nature Reserve, Hong Kong. *Chemosphere* **52**: 1647-1658

**Lima AIG, Pereira SIA, Figueira EMAP, Caldeira GCN, Caldeira HDQM** (2006) Cadmium detoxification in roots of *Pisum sativum* seedlings: relationship between toxicity levels, thiol pool alterations and growth. *Environ Exp Bot* **55**: 149-162

**Lindau C, Hossner L** (1982) Sediment fractionation of copper, nickel, zinc, chromium, manganese and iron in one experimental and three natural marshes. *J Environ Qual* **11**: 54-545

**Lindberg SE, Jackson DR, Huckabee JW, Janzen SA, Levin MJ, Lund JR** (1979) Atmospheric emissions and plant uptake of mercury from agricultural soils near the Almadén mercury mine. *J Environ Qual* **8**: 572-578

**Lodenius M** (1995) Mercury in terrestrial ecosystems: a review. In: Watras C, Huckabee J (eds.), *Mercury pollution - integration and synthesis*. Lewis, Ann Arbor, MI, pp 343-354

**Lodenius M, Tulisalo E, Soltanpour-Gargari A** (2003) Exchange of mercury between atmosphere and vegetation under contaminated conditions. *Sci Total Environ* **304**: 169-174



- Lozano-Rodríguez E, Luguera M, Lucena JJ, Carpena-Ruiz RO** (1995) Evaluation of two different acid digestion methods in closed systems of trace element determinations in plants. *Quim Anal* **14**: 27-30
- Lozano-Rodríguez E, Hernández LE, Bonay P, Carpena-Rui RO** (1997) Distribution of cadmium in root tissues of maize and pea plants: physiological disturbances. *J Exp Bot* **306**: 123-128
- MacFarlane GR, Burchett MD** (2000) Cellular distribution of copper, lead, and zinc in the grey mangrove *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh. *Aquat Bot* **68**: 45-59
- Maitani T, Kubota H, Sato K, Yamada T** (1996) The composition of metals bound to class III metallothionein (phytochelatin and their desglycyl peptide) induced by various metals in root cultures of *Rubia tinctorum*. *Plant Physiol* **110**: 1145-1150
- Marins RV, Lacerda LD, Goncalves GO and Paiva, EC** (1997) Effect of root metabolism on the post-depositional mobilization of mercury in salt marsh soils. *Bull Env Cont Toxicol* **58**: 733–738
- Marschner H** (1995) Mineral Nutrition of higher Plants, second ed. Academic Press Limited, London, U.K
- Martin JT, Juniper BE** (1970) The cuticles of plants. London: Edward Arnold
- Mason RP, Fitzgerald WF** (1993) The distribution and biogeochemical cycling of mercury in the equatorial Pacific Ocean. *Deep-Sea Research Part I* **40**: 1897–1924
- Matheus DJ, Moran BM, McCabe PF, Otte ML** (2004) Zinc tolerance, uptake, accumulation and distribution in plant and protoplasts of five European populations of the wetland grass *Glyceria fluitans*. *Aquat Bot* **80**: 39-52
- May MJ, Vernoux T, Leaver C, van Montagu M, Inzé D** (1998) Glutathione homeostasis in plants: implications for environmental sensing and plant development. *J Exp Bot* **49**: 649–667
- McCaffrey RJ, Thomson J** (1980) A record of the accumulation of sediment and trace metals in a Connecticut salt marsh. *Adv Geoph* **22**: 165-236
- McGrath SP, Zhao FJ** (2003) Phytoextraction of metals and metalloids from contaminated soils. *Curr Opin Biotechnol* **14**: 1-6
- McKersie BD, Leshem YY** (1994) Stress and stress coping in cultivated plants. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht-Boston-London pp 256
- Meagher RB, Rugh CL, Kandasamy MK, Gragson G, Wang NJ** (1998) Fourth International Conference on the Biogeochemistry of Trace Elements, Eds. Ishndar I.K. Hardy S.E., Chang A. C. and Pierzynski G.M. Ann Arbor Press, Berkeley, USA

**Medici LO, Azevedo RA, Smith RJ, Lea PJ** (2004) The influence of nitrogen supply on antioxidant enzymes in plant roots. *Funct Plant Biol* **31**: 1–9

**Meharg AA** (1994) Integrated tolerance mechanisms: constitutive and adaptative plant responses to elevated metal concentrations in the environment. *Plant Cell Environ* **17**: 939–989.

**Mehra RK, Tarbet EB, Gray WR, Winge DR** (1988) Metal-specific synthesis of two metallothioneins and gamma-glutamyl peptides in *Candida glabrata*. *PNAS* **85**: 8815–8819

**Mehra RK, Kodati R, Abdulah R** (1995) Chain-length-dependent (PbII) coordination in phytochelatins. *Biochem Biophys. Res Commun* **215**: 730–736

**Mehra RK, Miclat J, Kodati VR, Abdullah R, Hunter TC, Mulehandani P** (1996) Optical spectroscopic and reverse-phase HPLC analyses of Hg(II) binding to phytochelatins. *Biochem J* **314**: 73–82

**Memon AR, Aktoprakligul D, Ozdemir A, Vertii A** (2001) Heavy metal accumulation and detoxification mechanisms in plants. *Turk J Bot* **25**: 111–121

**Mendoza-Cózatl D, Loza-Tavera E, Hernández-Navarro A, Moreno-Sánchez R** (2005) Sulfur assimilation and glutathione metabolism under cadmium stress in yeast, protists and plants. *FEMS Microbiol Rev* **29**: 653–671

**Meuwly P, Rauser WE** (1992) Alteration of thiol pools in roots and shoots of maize seedlings exposed to cadmium – adaptation and development cost. *Plant Physiol* **99**: 8–15

**Meuwly P, Thibault P, Schwan AL, Rauser WE** (1995) Three families of thiol peptides are induced by cadmium in maize. *Plant J* **7**: 391–400

**Miersch J, Tschimedbalshir M, Bärlocher F, Grams Y, Pierau B Schierhorn A** (2001) Heavy metals and thiol compounds in *Mucor racemosus* and *Articulospora tetracladia*. *Mycol Res* **105**: 883–9

**Mika A, Minibayeva F, Beckett R, Lüthje S** (2004) Possible functions of extracellular peroxidases in stress-induced generation and detoxification of active oxygen species. *Phytochem Rev* **3**: 173–193

**Mittova V, Guy M, Tal M, Volokita M** (2002) Response of the cultivated tomato and its wild salt-tolerant relative *Lycopersicon pennellii* to salt-dependent oxidative stress: increased activities of antioxidant enzymes in root plastids. *Free Rad Res* **36**: 195–202

**Moller IM** (2001) Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **52**: 561–591

**Moreno FN, Anderson CWN, Stewart RB, Robinson BH** (2008) Phytofiltration of mercury-contaminated water: volatilisation and plant-accumulation aspects. *Environ Exp Bot* **62**: 78–85

**Moreno-Jimenez E, Gamarra R, Carpena-Ruiz RO, Millan R, Peñalosa JM, Esteban E** (2006) Mercury bioaccumulation and phytotoxicity in two wild plant species of Almadén area. *Chemosphere* **63**: 1969–1973

**Moreno-Jiménez E, Peñalosa JM, Esteban E, Ramón O. Carpena-Ruiz RO** (2007) Mercury accumulation and resistance to mercury stress in *Rumex induratus* and *Marrubium vulgare* grown in perlite *J Plant Nutr Soil Sci* **170**: 485–494

**Mucha AP, Almeida CMR, Bordalo AA, Vasconcelos MTSD** (2008) Salt marsh plants (*Juncus maritimus* and *Scirpus maritimus*) as sources of strong complexing ligands. *Est Coast Shelf Sci* **77**: 104–112

**Mueller MJ** (2004) Archetype signals in plants: the phytoprostanes. *Curr Op Plant Biol* **7**: 441–48

**Mukherjee AB** (2001) Behaviour of heavy metals and their remediation in metalliferous soils. In: Prasad, MNV (ed.), *Metals in the Environment. Analysis by Diversity*. Marcel Dekker, New York, pp 433–471

**Mutoh N, Hayashi Y** (1988) Isolation of mutants of *Schizosaccharomyces pombe* unable to synthesize cadystins, small cadmium-binding peptides. *Biochem Biophys Res Commun* **151**: 32–39

**Neumann D, Zurnieden U, Lichtenberger O, Leopold I** (1995) How does *Armeria maritima* tolerate high heavy metal ions? *J Plant Physiol* **146**: 704–717

**Newell SY, Hicks RE, Nicora M** (1982) Content of mercury in leaves of *Spartina alterniflora* Loisel in Georgia, U.S.A.: an update. *Est Coast Shelf Sci* **14**: 465–9

**Nieboer E, Richardson DHS** (1980) The replacement of the nondescript term 'Heavy Metals' by a biologically and chemically significant of metal ions. *Environ Pollut* **1**: 3–26

**Noctor G, Foyer C** (1998) Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*. **49**: 249–279

**Noctor G, Gomez L, Vanacker H, Foyer CH** (2002) Interactions between biosynthesis, compartmentation and transport in the control of glutathione homeostasis and signaling. *J Exp Bot* **53**: 1283–304

**Ohkawa H, Ohishi N, Yagi Y** (1979) Assay of lipid peroxides in animal tissue by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* **95**: 351–358

**Orson RA, Simpson RL, Good RE** (1992) A mechanism for the accumulation and retention of heavy metals in tidal freshwater marshes of the upper Delaware River Estuary. *Est Coast Shelf Sci* **34**: 17-186

**Ortega-Villasante C, Rellán-Álvarez R, Campo FFD, Carpena-Ruiz RO, Hernández LE** (2005) Cellular damage induced by cadmium and mercury in *Medicago sativa*. *J Exp Bot* **56**: 2239-2251

**Ortiz DF, Ruscitti KF, McCue, KF, Ow DW** (1995) Transport of metal-binding peptides by HMT1, a fission yeast ABC-type vacuolar membrane protein. *J Biol Chem* **27**: 4721-4728

**Otte ML** (1991) Contamination of coastal wetlands with heavy metals: factors affecting uptake of heavy metals by salt marsh plants. Cap 12. In: Rozema L, Verkleij JA (eds.), *Ecological responses to Environmental Stress*. Kluwer Academic Publishers. pp 126-133

**Otte ML, Haarsma MS, Broekman RA, Rozema J** (1993) Relation between heavy metal concentrations in salt marsh plants and soil. *Environ Pollut* **82** :13-22

**Paglia DE, Valentine WN** (1987) Studies on the quantitative and qualitative characterization of glutathion peroxidase. *J Lab Med* **70**: 158-165

**Patra M, Sharma A** (2000) Mercury toxicity in plants. *Bot Rev* **66**: 379–422

**Patra M, Bhowmik N, Bandopadhyay B, Sharma, A** (2004) Comparison of mercury, lead and arsenic with respect to genotoxic effects on plant systems and the development of genetic tolerance. *Environ Exp Bot* **52**: 199-223

**Pereira ME, Duarte A** (1994) Variabilidade das concentrações de mercúrio no Estuário de Estarreja, Aveiro. In: 4ª Conferência Nacional do Ambiente. Universidade Nova de Lisboa, Vol III

**Pereira ME** (1996) Distribuição, Reactividade e Transporte do Mercúrio na Ria de Aveiro. Tese de Doutoramento. Universidade de Aveiro

**Pereira ME, Duarte AC, Millward G, Vale C, Abreu SN** (1998) Tidal export of particulate mercury from the most contaminated area of Aveiro's Lagoon, Portugal. *Sci Tot Environ* **213**: 157–163

**Pereira ME, Lillebø AI, Pato P, Válega M, Coelho JP, Lopes CB, Rodrigues S, Cachada A, Otero M, Pardal MA, Duarte AC** (2008) Mercury pollution in Ria de Aveiro (Portugal): a review of the system assessment. *Environ Monit Assess. in press*

**Peverly JH, Surface JM, Wang T** (1995) Growth and trace metal absorption by *Phragmites australis* in wetlands constructed for landfill leachate treatment. *Ecol Eng* **5**: 21-35

**Piechalack A, Tomaszewska B, Baralkiewicz D, Malecka A** (2002) Accumulation and detoxification of lead ions in legumes. *Phytochemistry* **60**: 152–153

**Pilon-Smits E, Pilon M** (2000) Breeding mercury-breathing plants for environmental clean-up. *Trends Plant Sci* **5**: 235-236

**Pio CA, Costa MJ, Borrego CA** (1986) Atmospheric mercury in an industrialized region. In: *Chemicals in the Environment*. Lester JN, Perry R, Sterruff RM (eds.) 123-128

**Poschenrieder C, Barceló J** (2003) Estrés por Metales Pesados. In: Reigosa MJ, Pedrol N, Sanchez A (eds.), *Ecofisiología Vegetal*. Paraninfo, Madrid

**Prasad MN, Hagemeyer J** (1999) Heavy Metal Stress in Plants (eds M.N. Prasad & J. Hagemeyer). Springer, Berlin, Germany

**Przemeck E, Haase NU** (1991) On the bonding of manganese, copper and cadmium to peptides of the xylem sap of plant roots. *Wat Air Soil Pollut* **57–58**: 569–577

**Rahn Jr WR** (1973) The role of *Spartina alterniflora* in the transfer of mercury in a salt marsh environment. MS thesis. Georgia Institute of Technology, Atlanta, GA, USA

**Ramos I, Esteban E, Lucena JJ, Garate A** (2002) Cadmium uptake and subcellular distribution in plants of *Lactuca* sp. Cd-Mn interaction. *Plant Sci* **162**: 761-767

**Raskin I** (1996) Plant genetic engineering may help with environmental cleanup. *PNAS* **93**: 3164-3166

**Rauser WE** (1990) Phytochelatins. *Ann Rev Biochem* **59**: 61-86

**Rauser WE** (1999) Structure and function of metal chelators produced by plants; the case for organic acids, amino acids, phytin and metallothioneins. *Cell Biochem Biophys* **31**: 19-48

**Rauser WE** (1995) Phytochelatins and related peptides. Structure, biosynthesis, and function. *Plant Physiol* **109**: 1141-1149

**Rauser WE** (2000) Roots of maize seedlings retain most of their cadmium through two complexes. *J Plant Physiol* **156**: 545-551

**Rauser WE, Meuwly P** (1995) Retention of cadmium in roots of maize seedlings. Role of complexation by phytochelatins and related thiol peptides. *Plant Physiol* **109**: 195-202

**Ravit B, Ehrenfeld JG, Haggblom MM** (2003) A comparison of sediment microbial communities associated with *Phragmites australis* and *Spartina alterniflora* in two brackish water wetlands of New Jersey. *Estuaries* **26**: 465-474

**Reddy CN, Patrick Jr WH** (1977) Effect of redox potential and pH on the uptake of cadmium and lead by rice plants. *J EnvironQual* **6**: 259–262

**Reese RN, Wagner CJ** (1987) Effects of buthionine sulfoximine on Cd-binding peptide levels in suspension-cultured tobacco cells treated with Cd, Zn, or Cu. *Plant Physiol* **84**: 574-577

**Rellán-Álvarez R, Ortega-Villasante C, Álvarez-Fernández A, Campo FF, Hernández LE** (2006) Stress responses of *Zea mays* to cadmium and mercury. *Plant Soil* **279**: 41-50

**Ribeyre F, Boudou A** (1994) Experimental study of inorganic and methylmercury bioaccumulation by four species of freshwater rooted macrophytes from water and sediment contamination sources. *Ecotoxicol Environ Saf* **28**: 270-286

**Richardson CJ, Qian S, Craft CB, Qualls RG** (1997) Predictive models for phosphorus retention in wetlands. *Wetl Ecol Managt* **4**: 159-175

**Romero-Puertas MC, Palma JM, Gómez M, del Río LA, Sandalio LM** (2002) Cadmium causes the oxidative modification of proteins in pea plants. *Plant Cell Environ* **25**: 677-686

**Rozema J, Bijwaard P, Prast G, Broekman R** (1985) Ecophysiological adaptations of coastal halophytes from foredunes and salt marshes. *Vegetatio* **62**: 499-521.

**Rozema J, Otte ML, Broekman RA, Kamber G, Punte H** (1990) The response of *Spartina anglica* to heavy metal pollution. In: Gray AJ (ed.), *Spartina anglica*. HMSO, London, pp 39-47

**Rüegsegger D, Schumtz D, Brunold C** (1990) Regulation of Glutathione Synthesis by Cadmium in *Pisum sativum* L. *Plant Physiol* **93**: 1579-1584

**Sabeh F, Wright T, Norton SJ** (1993) Purification and characterization of a glutathione peroxidase from *Aloe vera* plant. *Enzyme Prot* **47**: 92-98

**Sadiq M** (1992) Toxic Metal Chemistry in Marine Environment. Marcel Dekker, New York

**Salin ML** (1987) Toxic oxygen species and protective systems of the chloroplast. *Physiol Plant* **72**: 681-689

**Salt DE, Rauser WE** (1995) MgATP-dependent transport of phytochelatins across the tonoplast of oat roots. *Plant Physiol* **107**: 1293-1301

**Salt DE, Smith RD, Raskin I** (1998) Phytoremediation. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **49**: 643-668

**Sandalio LM, Dalurzo HC, Gomez M, Romero-Puertas MC, del Rio LA** (2001) Cadmium-induced changes in the growth and oxidative metabolism of pea plants. *J Exp Bot* **52**: 2115-2126

**Sanità di Toppi L, Gabrielli R** (1999) Response to cadmium in higher plants. *Environ Exp Bot* **41**: 105-130

**Schat H, Llugany M, Bernhard R** (2000) Metal-specific patterns of tolerance, uptake and transport of heavy metals in hyperaccumulating and non-hyperaccumulating metallophytes. In: Terry N, Banuelos G (eds) *Phytoremediation of contaminated soil and water*. CRC Press LLC 171-188

**Schat H, Kalf MMA** (2002) The role of phytochelatins in constitutive and adaptative heavy metal tolerances in hyperaccumulator and non-hyperaccumulator metallophytes. *J Exp Bot* **53**: 2381-2392

**Schützendübel A, Polle A** (2002) Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. *J Exp Bot* **53**: 1351-1365

**Senden MHMN, Van Paassen FJM, Van der Meer AJGM, Wolterbeek HT** (1992) Cadmium citric acid xylem interaction in tomato plants. *Plant Cell Environ* **15**: 71-79

**Senden MHMN, Van der Meer AJGM, Verburg TG, Wolterbeek HT** (1994) Effects of cadmium on the behavior of citric acid in isolated tomato xylem cell walls. *J Exp Bot* **45**: 597-606

**Sersen F, Kralova K, Bumbalova A** (1998) Action of mercury on the photosynthetic apparatus of spinach chloroplasts. *Photosynthetica* **35**: 551-559

**Shu WS, Ye ZH, Lan CY, Zhang ZQ, Wong MH** (2002) Lead, zinc and copper accumulation and tolerance in populations of *Paspalum distichum* and *Cynodon dactylon*. *Environ Pollut* **120**: 445-453

**Silva MHA** (2000) Aspectos morfológicos e ecofisiológicos de algumas halófitas do sapal da Ria de Aveiro. Dissertação de Doutorado. Universidade de Aveiro

**Singh, BR e MacLaughlin, MJ** (1999) Cadmium in soils and plants: Summary and research perspectives. In: MacLaughlin MJ, and Singh BR (eds.), *Cadmium in soils and plants*. Kluwer Academic Publishers, Boston, pp 257-267

**Sinha S, Gupta M, Chandra P** (1996) Bioaccumulation and biochemical effects of mercury in the plant *Bacopa monnieri* (L). *Environ Toxicol Wat Qual* **11**: 105-112

**Smirnoff N** (2000) Ascorbic acid: metabolism and functions of a multifaceted molecule. *Curr Opin Plant Biol* **3**: 229-235

**Sneller FEC, van Heerwaarden PLM, Koevoets PLM, Vooijs R, Schat H, Verkleij AC** (2000) Derivatization of phytochelatins from *Silene vulgaris*, induced upon exposure to arsenate and cadmium: comparison of derivatization with Ellman's reagent and monobromobimane. *J Agric Food Chem* **48**: 4014-4019

**Sousa AI, Caçador I, Lillebø AI, Pardal MA** (2008) Heavy metal accumulation in *Halimione portulacoides*: Intra -and extra-cellular metal binding sites. *Chemosphere* **70**: 850-857

**Speiser DM, Abrahamson SL, Bañuelos G, Ow DW** (1992) *Brassica juncea* produces a phytochelatin-cadmium-sulfide complex. *Plant Physiol* **99**: 817-821

**Srivastava S, Mishra S, Tripathi RD, Dwivedi S, Gupta DK** (2006) Copper-induced oxidative stress and responses of antioxidants and phytochelatin in *Hydrilla verticillata* (L.f.) Royle. *Aquat Toxicol* **80**: 405-415

**Steffens JC, Hunt DF, Williams BG** (1986) Accumulation of non-protein metal-binding polypeptides (gamma-glutamyl-cysteinyl)<sub>n</sub>-glycine in selected cadmium resistant tomato cells. *J Biol Chem* **261**: 13879-13882

**Steffens JC** (1990) The heavy metal-binding peptides of plants. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **41**: 553-575

**Strasdeit H, Duhme A-K, Kneer R, Zenk MH, Hermes C, Nolting H-F** (1991) Evidence for discrete Cd(SCys)<sub>4</sub> units in cadmium phytochelatin complexes from EXAFS spectroscopy. *J Chem Soc Chem Comm* **91**: 1129-1130

**Strid A** (1993) Increased expression of defense genes in *Pisum sativum* after exposure to supplementary ultraviolet-B radiation. *Plant Cell Physiol* **34**: 949-953

**Sun Q, Ye ZH, Wang XR, Wong MH** (2007) Cadmium hyperaccumulation leads to an increase of glutathione rather than phytochelatin in the cadmium hyperaccumulator *Sedum alfredii*. *J Plant Physiol* **164**: 1489-1498

**Sundby B, Vale C, Caçador MI, Catarino FM, Madureira MJ, Caetano M** (1998) Metal-rich concretions on the roots of salt marsh plants. *Limn Ocean* **43**: 245-252

**Thompson JE, Legge RJ, Barber RF** (1987) The role of free radicals in senescence and wounding. *New Phytol* **105**: 317-244

**Tausz M, Helena Šircelj H, Grill D** (2004) The glutathione system as a stress marker in plant ecophysiology: is a stress-response concept valid?. *J Exp Bot* **55**: 1955-1962

**Tsugane K, Kobayashi K, Niwa Y, Ohba Y, Wada K, Kobayashi H** (1999) A recessive *Arabidopsis* mutant that grows enhanced active oxygen detoxification. *Plant Cell* **11**: 1195-206

**Tukendorf A, Rauser WE** (1990) Changes in glutathione and phytochelatin in roots of maize seedlings exposed to cadmium. *Plant Sci* **70**: 155-166

**United States Environmental Protection Agency (USEPA)** (2000) Electrokinetic and phytoremediation in situ treatment of metal-contaminated soil: State-of-the-Practice. draft



for final review. EPA/542/R-00/XXX. US Environmental Protection Agency, Office of Solid Waste and Emergency Response Technology Innovation Office, Washington, DC

**Vale C, Catarino FM, Caçador MI** (1990) Presence of metal rich rhizoconcretions on the roots of *Spartina maritima* from the salt marshes of the Tagus estuary, Portugal. *Sci Total Environ* **97/98**: 617-626

**Válega M** (2002) Efeito das plantas na acumulação de mercúrio em sedimentos de sapais. Tese de Mestrado. Universidade de Aveiro

**Válega M, Lillebø AI, Pereira ME, Caçador I, Duarte AC, Pardal MA** (2008) Mercury in salt marshes ecosystems: *Halimione portulacoides* as biomonitor. *Chemosphere* **73**: 1224-1229

**Válega M, Lima AIG, Figueira EMAP, Pereira E, Pardal MA, Duarte AC** (2009) Mercury intracellular partitioning and chelation in a salt marsh plant, *Halimione portulacoides* (L.) Aellen: strategies underlying tolerance in environmental exposure *Chemosphere* **74**: 530-536

**Van Assche F, Clijsters H** (1990) Effects of metals on enzyme activity in plants. *Plant Cell Environ* **13**: 195–206

**Vatamaniuk OK, Mari S, Lu YP, Rea PA** (2000) Mechanisms of heavy metal ion activation of phytochelatin (PC) synthase. Blocked thiols are sufficient for PC synthase-catalysed transpeptidation of glutathione and related thiol peptides. *J Biol Chem* **275**: 31451-31459

**Vatamaniuk OK, Mari S, Lang A, Chalasani S, Demkiv LO, Rea PA** (2004) Phytochelatin synthase, a dipeptidyltransferase that undergoes multisite acylation with c-glutamylcysteine during catalysis. *J Biol Chem* **279**: 22449–22460

**Vázquez S, Hernández LE, Carpena-Ruiz, RO** (2001) Determinación de compuestos tiólicos como indicadores de contaminación de Hg en plantas de maíz y guisante. In: Alcaraz CF, Carvajal M, Martínez V (eds.), *Nutrición Mineral en una agricultura sostenible mediterránea*, vol 2. CEBAS-CSIC, Consejería de Agricultura, Agua y M. Ambiente, Murcia, Spain, pp 357-363

**Verkleij JA, Schat H** (1989) Mechanisms of metal tolerance in higher plants. In: Shaw, AJ (ed.), *Heavy Metal Tolerance in Plants: Evolutionary Aspects*, pp 179-194

**Vesk PA, Nockolds, CE, Allaway WG** (1999) Metal localization in water hyacinth roots from an urban wetland. *Plant, Cell Environ* **22**: 149-158

**Vögeli-Lange R, Wagner GJ** (1990) Subcellular localization of cadmium and cadmium-binding peptides in tobacco leaves. *Plant Physiol* **92**: 1086-1093

**Wang Y, Greger M** (2004) Clonal Differences in Mercury Tolerance, Accumulation, and Distribution in Willow. *J Environ Qual* **33**: 1779-1785

**Wagner GJ** (1993) Accumulation of cadmium in crop plants and its consequences to human health. *Adv Agron* **51**: 173-212

**Waldron LJ, Terry N** (1975) Effect of mercury vapor on sugar beets. *J Environ Qual* **4**: 58- 60

**Walton BT, Anderson TA** (1992) Plant-microbe treatment systems for toxic waste. *Curr Opin Biotechnol* **3**: 267-270

**Wang TC, Weissman JC, Ramesla G, Varadarajan R, Benemann JR** (1998) Heavy metal binding and removal by *phormidium*. *Bull Environ Cont Toxicol* **60**: 739-744

**Weis JS, Windham L, Santiago-Bass C, Weis P** (2002) Growth, survival, and metal content of marsh invertebrates fed diets of detritus from *Spartina alterniflora* Loisel. and *Phragmites australis* Cav. Trin. ex Steud. from metal-contaminated and clean sites. *Wetl Ecol Manag* **10**: 71-84

**Weis JS, Weis P** (2004) Metal uptake, transport and release by wetland plants: implication for phytoremediation and restoration. *Environ Int* **30**: 685-700

**Wheeler CR, Salzman JA, Elsayed NM** (1990) Automated assays for superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, and glutathione reductase activity. *Anal Biochem* **184**: 193–199

**Willekens H, Chamnongpol S, Davey M, Schraudner M, Langebartels C, Van Montagu M** (1997) Catalase is a sink for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and is indispensable for stress defence in C3 plants. *EMBO J* **16**: 4806–4816

**Williams TP, Bubb JM, Lester JN** (1994a) Metal accumulation within salt marsh environments: a review. *Mar Pollut Bull* **28**: 277 – 290

**Williams TP, Bubb JM, Lester JN** (1994b) The occurrence and distribution of trace metals in halophytes. *Chemosphere* **2**: 1189-1199

**Windham L, Weis JS, Weis P** (2003) Uptake and distribution of metals in two dominant salt marsh macrophytes, *Spartina alterniflora* (cordgrass) and *Phragmites australis* (common reed). *Est Coast Shelf Sci* **56**: 63-72

**Winkler BS, Orselli SM, Rex TS** (1994) The redox couple between glutathione and ascorbic acid: a chemical and physiological erspective. *Free Rad Biol Med* **17**: 333-349

**Xiang CB, Werner BL, Christensen EM, Oliver DJ** (2001) The biological functions of glutathione revisited in Arabidopsis transgenic plants with altered glutathione levels. *Plant Physiol* **126**: 564–574

**Xiao-E Y, Xiao-Fen J, Ying FG** (2005) Molecular Mechanisms and Genetic Basis of Heavy Metal Tolerance/Hyperaccumulation. *J Integr Plant Biol* **47**: 1025

- Yan S, Tsay C, Chen Y** (2000) Isolation and characterisation of phytochelatin synthase in rice seedlings. *PNAS* **244**: 202–207
- Yang X, Feng Y, He Z, Stoffella PJ** (2005) Molecular mechanisms of heavy metal hyperaccumulation and phytoremediation. *J Trace Elem Med Biol* **18**: 339-353
- Yoshimura E, Kabuyama Y, Yamazaki S, Toda S** (1990) Activity of poly  $\gamma$ -(glutamylcisteinyl)glycine synthesis in crude extract of fission east, *Schizosaccharomyces pombe*. *Agric Biol Chem* **54**: 3025-3026
- Zachara JM, Smith SC, Resch, CT, Cowan CE** (1992) Cadmium sorption to soil separates containing layer silicates, iron and aluminium oxides. *Soil Sci Soc Am J* **56**: 1074-1084
- Zhang H, Xu W, Guo J, He Z, Ma M** (2005) Coordinated responses of phytochelatin and metallothioneins to heavy metals in garlic seedlings. *Plant Science* **169**: 1059–1065
- Zhang FQ, Wang YS, Lou ZP, Dong JD** (2007) Effect of heavy metal stress on antioxidative enzymes and lipid peroxidation in leaves and roots of two mangrove plant seedlings (*Kandelia candel* and *Bruguiera gymnorhiza*). *Chemosphere* **67**: 44-50
- Zhou ZS, Huang SQ, Guo K, Mehta KK, Zhang PC, Yang ZM** (2007) Metabolic adaptations to mercury-induced oxidative stress in roots of *Medicago sativa* L. *J Inorg Biochem* **101**: 1-9
- Zhou ZS, Wang SJ, Yang ZM, Min Z** (2008) Biological detection and analysis of mercury toxicity to alfalfa (*Medicago sativa*) plants. *Chemosphere* **70**: 1500-1509
- Zillioux EJ, Porcella DB, Benoit JM** (1993) Mercury cycling and effects in freshwater wetland ecosystems. *Environ Toxicol Chem* **12**: 2245-2264
- Zenk MH** (1996) Heavy metal detoxification in higher plants – a review. *Gene* **179**: 21–30
- Zornoza P, Vazquez S, Esteban E, Fernandez-Pascual M, Carpena R** (2002) Cadmium-stress in nodulated white lupin: Strategies to avoid toxicity. *Plant Physiol Biochem* **40**: 1003-1009